

Studie zum Vorkommen der Genotypen PCV2a und PCV2b des  
Porcinen Circovirus Typ 2 in schweinehaltenden Betrieben mit  
unterschiedlichen PCV2-Impfregimen

Von Florian Alfred Szikora

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Studie zum Vorkommen der Genotypen PCV2a und PCV2b des  
Porcinen Circovirus Typ 2 in schweinehaltenden Betrieben mit  
unterschiedlichen PCV2-Impfregimen

von Florian Alfred Szikora

aus München

München, 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweins

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch Dr. Matthias Eddicks

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

**Tag der Promotion: 31.01.2015**

Den Tieren

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>14</b>
<b>1.</b>	<b>Circoviren .....</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>Porcine Circoviren .....</b>	<b>14</b>
2.1.	Porcines Circovirus Typ 1 (PCV1) .....	16
2.2.	Porcines Circovirus Typ 2 (PCV2) .....	16
2.3.	Vorkommen der Genotypen PCV2a und PCV2b.....	19
2.4.	PCV2 in Deutschland .....	20
2.5.	PCV2-assoziierte Erkrankungen .....	22
2.5.1.	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) .....	23
2.5.2.	Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrome (PDNS) .....	24
2.5.3.	Reproduktionsstörungen (Reproductive failure) .....	26
2.5.4.	Enteritis (Enteric disease).....	26
2.5.5.	PCV2-assoziierte Atemwegserkrankungen .....	27
2.5.6.	Subklinische PCV2-Infektion .....	28
<b>3.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>28</b>
3.1.	PCV2 Genomnachweis .....	29
3.1.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	29
3.1.2.	In-situ-Hybridisierung (ISH).....	30
3.2.	Antikörpernachweis .....	30
3.2.1.	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA).....	30
<b>4.</b>	<b>Vakzinierung gegen PCV2.....</b>	<b>31</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>34</b>
<b>1.</b>	<b>Anzeige des Tierversuchsvorhabens.....</b>	<b>34</b>
<b>2.</b>	<b>Ziel der Untersuchung .....</b>	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>Studienbetriebe.....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>Impfstatus .....</b>	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>Studientiere .....</b>	<b>36</b>

5.1.	Sauen .....	36
5.2.	Ferkel.....	36
<b>6.</b>	<b>Probenentnahme.....</b>	<b>36</b>
6.1.	Blutentnahme .....	36
<b>7.</b>	<b>Labordiagnostische Untersuchungen .....</b>	<b>37</b>
7.1.	Quantitative PCV2-PCR .....	37
7.2.	Genotyp-differenzierende PCV2-PCR.....	38
7.3.	Volllängensequenzierung des PCV2 .....	39
<b>8.</b>	<b>Proben-Codierung.....</b>	<b>40</b>
<b>9.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>40</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>1.</b>	<b>Qualitative Auswertung der Serumproben mittels PCV2 real-time PCR.....</b>	<b>42</b>
1.1.	Häufigkeit PCV2 positiver Tiere .....	42
1.2.	Vorkommen von PCV2a und PCV2b im Studienverlauf.....	43
1.2.1.	<u>Vorkommen von PCV2b</u> .....	43
1.2.2.	<u>Vorkommen von PCV2a</u> .....	44
1.2.3.	<u>PCV2a und PCV2b simultan im selben Tier:</u> .....	44
<b>2.</b>	<b>Quantitative Auswertung der Genotypen im Studienverlauf .....</b>	<b>47</b>
2.1.	PCV2 Virämie nach Genotypen .....	47
2.2.	Virämie-Verlauf: Betriebe, die nicht gegen PCV2 vakzinierten.....	50
2.2.1.	<u>Betrieb 1</u> .....	50
2.2.1.1.	<u>PCV2a:</u> .....	50
2.2.1.2.	<u>PCV2b:</u> .....	50
2.2.1.3.	<u>PCV2a und PCV2b simultan im selben Tier:</u> .....	51
2.2.2.	<u>Betrieb 2</u> .....	52
2.2.2.1.	<u>PCV2b:</u> .....	52
2.2.3.	Betrieb 3 .....	54
2.2.3.1.	<u>PCV2b:</u> .....	54
2.3.	Virämie-Verlauf: Betriebe, die Ferkel gegen PCV2 vakzinierten .....	56
2.3.1.	Betrieb 4 .....	56

2.3.1.1.	<u>PCV2b:</u> .....	57
2.3.2.	Betrieb 5 .....	58
2.3.2.1.	<u>PCV2b:</u> .....	58
2.3.3.	Betrieb 6 .....	60
2.4.	Virämie-Verlauf: Betriebe, die nur Sauen gegen PCV2 vakzinierten	60
2.4.1.	Betrieb 7 .....	60
2.4.1.1.	<u>PCV2a:</u> .....	61
2.4.2.	Betrieb 8 .....	62
2.4.2.1.	<u>PCV2b:</u> .....	62
2.4.3.	Betrieb 9 .....	64
2.4.3.1.	<u>PCV2b:</u> .....	64
<b>3.</b>	<b>Verschiedene PCV2-Genotypen in Einzeltieren.....</b>	<b>66</b>
<b>4.</b>	<b>PCV2-Sequenzen .....</b>	<b>67</b>
4.1.	Monitoring von PCV2b-Genomsequenzen bei einem Einzeltier .....	70
<b>5.</b>	<b>Phylogenetischer Stammbaum der nachgewiesenen PCV2 .....</b>	<b>71</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>Häufigkeit PCV2-positiver Tiere .....</b>	<b>73</b>
<b>2.</b>	<b>Häufigkeit PCV2-positive Tiere nach Impfgruppen.....</b>	<b>74</b>
<b>3.</b>	<b>PCV2 Virämie nach Genotypen.....</b>	<b>76</b>
<b>4.</b>	<b>Änderung des Genotyps bei Einzeltieren .....</b>	<b>77</b>
<b>5.</b>	<b>PCV2-Genomsequenzen .....</b>	<b>78</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>80</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>82</b>
<b>VIII.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>84</b>
<b>IX.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>86</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>103</b>



## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AAS	Alte Altsau (5. Wurf und mehr)
AS	Altsau (2. bis 4. Wurf)
BBTV	Banana Bunchy Top Virus
BFDV	Beak and Feather Disease Virus
BOOP	Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia
BY	Bayern
CaCV	Canary Circovirus
CAV	Chicken Anaemia Virus
CFDV	Coconut Foliar Decay Virus
DNA	Deoxyribonucleic acid
Du-CV	Duck-Circovirus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	Ferkel
FAM	6-FAM-phosphoramidit (Fluoreszenzfarbstoff)
FI	PCV2 Ferkelimpfbetrieb
Fi-CV	Finch-Circovirus
GoCV	Goose Circovirus
Gu-CV	Gull-Circovirus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin G
ISH	In-situ-Hybridisierung

JS	Jungsau (1. Wurf)
LW	Lebenswoche
min	Minuten
n	Anzahl
NI	PCV2 Nichtimpfbetrieb
NDS	Niedersachsen
nPCR	Nested PCR
NRW	Nordrhein-Westfalen
ORF1	Open Reading Frame 1
ORF2	Open Reading Frame 2
ORF3	Open Reading Frame 3
PASC	Pairwise Sequence Comparison
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PCV1	Porcines Circovirus Typ 1
PCV2	Porcines Circovirus Typ 2
PCV2-ED	PCV2 enteric disease
PCV2-LD	PCV2 lung disease
PCV2-RD	PCV2 reproductive disease
PCV2-SD	Porcine Circovirus 2 systemic disease
PCV2-SI	PCV2 subclinical infection
PCVAD	PCV-Associated Diseases
PCVD	Porcine Circovirus Diseases

PDNS	Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom
PiCV	Pigeon Circovirus
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome
PNP	Proliferative and necrotizing pneumonia
PPV	Porcines Parvovirus
PRDC	Porcine Respiratory Disease Complex
PRRSV	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
qPCR	quantitative PCR
RD	respiratory disease
RFLP	Restriktionsfragment-längenpolymorphismus
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonukleasen
RT-PCR	Real-time PCR
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Sau
sek	Sekunden
SCSV	Subterranean Clover Stunt Virus
SI	PCV2 Sauenimpfbetrieb
ST	Sachsen-Anhalt
µL	Mikroliter

## **I. EINLEITUNG**

Das Porcine Circovirus Typ 2 (PCV2) löst bei Schweinen ernstzunehmende Erkrankungen wie das Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) aus. PCV2 assoziierte Erkrankungen werden als PCV2 associated diseases (PCVAD) bezeichnet (Opriessnig et al., 2007). Die Impfung gegen PCV2 ist die wirksamste Maßnahme zur Kontrolle von PCVADs, dennoch treten in Impfbetrieben zum Ende der Mast PCV2-Virämien auf (Kixmöller et al., 2008, Haake et al., 2014). Das Virus kann auch durch Massenimpfung nicht eradiziert werden (Feng et al., 2014). Basierend auf den sogenannten Pairwise Sequence Comparisons wurden drei verschiedene PCV2 Genotypen benannt, das PCV2a, PCV2b und PCV2c (Segales et al., 2008). Die Genotypen können außerdem weiter in sogenannte Clades untergliedert werden, es wurden von Olvera et al. (2007) fünf Clades für PCV2a und drei Clades für PCV2b beschrieben. Die phylogenetische Einordnung der verschiedenen PCV2 Isolate kann auf Basis der Sequenzierung des Gesamtgenoms geschehen, oder auf Basis der Teilsequenzierung eines bestimmten Genomabschnitts, dem des Open Reading Frame 2 (ORF2) von PCV2. Da sich beide Methoden im Ergebnis nicht signifikant unterscheiden ist die ORF2 basierte Einordnung die gängige Standardmethode (Olvera et al., 2007, Tribble und Rowland, 2012). Während PCV2a bis zum Jahr 2003 bei Schweinen mit PCV2 assoziierten Erkrankungen der zumeist gefundene Genotyp war, kommt seither PCV2b häufiger vor (Allan et al., 2012). Alle kommerziell verfügbaren PCV2-Vakzinen basieren auf Genotyp a, werden jedoch als wirksam gegen PCV2a und PCV2b eingestuft (Opriessnig et al., 2007). Trotz flächendeckender Impfmaßnahmen treten in jüngster Zeit Erkrankungen auf, die klinisch einen Zusammenhang mit PCV2 vermuten lassen. Parallel dazu wurden in den USA (Opriessnig et al., 2013b) und in Asien (Guo et al., 2010) mutierte PCV2b Stämme entdeckt und eine im Vergleich zu herkömmlichen Stämmen gesteigerte Pathogenität angenommen (Guo et al., 2012). Über die aktuelle Verteilung der Genotypen PCV2a und PCV2b in Deutschland und wie sich diese möglicherweise auf die PCV2-Virämie bei Tieren mit oder ohne Impfschutz auswirkt ist bisher nur wenig bekannt. Die vorliegende Studie soll darüber Aufschluss geben. Außerdem soll mithilfe der

Genomsequenzierung einiger Isolate eine Übersicht gegeben werden, welchen Clades die gefundenen PCV2-Stämme angehören und ob sich diese im Verlauf einer Aufzucht- und Mastperiode verändern. In der vorliegenden Studie wurden Ferkel neun deutscher Schweinehaltungsbetriebe von Geburt bis Ende der Mast hinsichtlich ihres PCV2-Virämiestatus beobachtet, dabei wurde berücksichtigt, ob die Tiere mit Genotyp PCV2a oder PCV2b infiziert waren. Bei ausgewählten Tieren wurde zusätzlich die Genomsequenz des jeweiligen PCV2-Isolats ermittelt. Der Studie liegt einerseits die Hypothese zugrunde, dass sich Genomsequenzen von PCV2-Isolaten, die innerhalb einzelner Betriebe gewonnen werden können, nur minimal unterscheiden werden. Es wird des Weiteren davon ausgegangen, dass sich der weltweite Trend des Rückgangs von PCV2a zugunsten einer Zunahme von PCV2b für die Studienbetriebe bestätigen lassen wird.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Circoviren**

Circoviren gehören neben Gyroviren zur Familie der Circoviridae. Zum Genus der Circoviren gehören neben dem Porcinen Circovirus Typ 1 (PCV1) und Typ 2 (PCV2) auch noch andere Spezies wie das Beak and Feather Disease Virus (BFDV) (Regnard et al., 2014), Canary Circovirus (CaCV) (Phenix et al., 2001), Goose Circovirus (GCV) und Pigeon Circovirus (PiCV) (Todd et al., 2001b) sowie die Spezies Duck Circovirus (DuCV) (Wen et al., 2014), Finch Circovirus (FiCV) und Gull Circovirus (GuCV) (Todd et al., 2007). Mit einem Durchmesser von 15 bis 25 Nanometern sind sie die kleinsten Viren, die in der Lage sind, sich autonom in eukaryotischen Zellen zu vermehren (Mankertz, 2008). Die Virione der Circoviridae sind unbehüllt und weisen die Symmetrie eines Ikosaeders auf. Sie beinhalten ein einziges Molekül Einzelstrang-DNA, dieses ist zirkulär angeordnet und durch kovalente Bindungen geschlossen. Die Größe des Genoms liegt bei circa 2000 Nukleotiden (Mankertz, 2008, Cortey et al., 2011). Zur Herkunft der Circoviren wird von Gibbs und Weiller (1999) vermutet, dass ein Gen der bei Vertebraten vorkommenden Caliciviren von einem Pflanzen-Nanovirus aufgenommen und in dessen Genom integriert wurde. Schon davor, im Jahr 1997 hatten Meehan et al. (1997) bei einer Analyse der Porcinen Circoviren festgestellt, dass deren Proteinzusammensetzung eher einigen Pflanzen-Circoviren wie z.B. dem Banana Bunchy Top Virus (BBTV), dem Subterranean Clover Stunt Virus (SCSV), oder dem Coconut Foliar Decay Virus (CFDV) entsprachen, als der anderer bei Tieren vorkommenden Circoviren, wie z.B. dem Chicken Anaemia Virus (Meehan et al., 1997). Alle bei Tieren vorkommenden Circoviren, bis auf PCV1, haben die Eigenschaft das Immunsystem des Wirts zu schwächen und damit andere Erkrankungen zu begünstigen (Todd et al., 2001a).

### **2. Porcine Circoviren**

Porcine Circoviren wurden von Tischer et al. (1974) im Jahr 1974 erstmals in einer Schweinenieren Zellkultur (PK/15 (ATCC-CCL 33)) entdeckt und zunächst als papovavirus- und picornavirus-ähnliche Partikel beschrieben (Tischer et al.,

1974). Nur bei Schweinen konnten Antikörper gegen das bis dahin unbekannte Virus gefunden werden. Größe und Beschaffenheit wiesen auf ein bisher bei Tieren nicht beschriebenes Virus hin, folgend wurde es als Porcines Circovirus benannt (Tischer et al., 1982). Das Virus wurde der Familie der Circoviridae zugeordnet. Im Jahr 1986 fanden Tischer et al. (1986) heraus, dass Antikörper gegen Porcine Circoviren in 77 bis 95% aller Schweineschlachtkörper aus Norddeutschland zu finden sind. Außerdem wiesen sie Antikörper gegen PCV in Wildschweinen nach, die in Deutschland im Umkreis von Berlin erlegt worden waren. Sie stellten daher die These auf, dass Porcine Circoviren in Schweinepopulationen offenbar sehr verbreitet sind (Tischer et al., 1986). Auch in anderen Ländern, wie z.B. in Kanada wurden Antikörper gegen Circoviren im Serum von Schweinen nachgewiesen (Dulac und Afshar, 1989). Dank verbesserter diagnostischer Möglichkeiten wurde im Jahr 1998 bei Schweinen ein bis dahin unbekanntes virulentes circovirus-ähnliches Virus isoliert (Ellis et al., 1998). Im Jahr 1995 wurde erstmals das Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (Harding, 2004) beschrieben. Allan et al. (1998b) stellten fest, dass sich das bei erkrankten Schweinen gefundene Virus, von dem, das als Kontaminant von Schweinenieren Zellkulturen bekannt war unterschied, und bezeichneten es zunächst als Porcines-Circovirus-ähnlich, dann als neues Circovirus bei Schweinen mit Symptomen des Kümmerens (Allan et al., 1998a). Das Virus, welches schon zuvor als apathogener Kontaminant von Zelllinien bekannt war, wird in der FolgeLiteratur als PCV1 und das neue, krankheitsauslösende Virus als PCV2 bezeichnet (Allan und Ellis, 2000). Seither werden in der Literatur im Genus Circovirus der Familie Circoviridae zumeist zwei verschiedene Circoviren-Spezies beschrieben, die bei der Tierart Schwein vorkommen, das Porcine Circovirus Typ 1 (PCV1) und das Porcine Circovirus Typ 2 (PCV2). Die Genomsequenzen sind zu 83 % identisch am Open Reading Frame 1 (ORF1) und zu 67 % am ORF 2 (Allan et al., 2012). Während PCV2 nach aktuellem Forschungsstand mit vielen bedeutenden Schweinekrankheiten, auch PCVAD, PCV2-associated diseases genannt (Opriessnig et al., 2007), in Verbindung gebracht wird, wird das PCV1 als nicht krankheitsauslösend eingestuft (Mankertz, 2008, Allan et al., 2012). Lediglich von einer Arbeitsgruppe wurde vermutet, dass PCV1 Lungenblutungen bei Föten verursacht (Saha et al., 2011). Von Gagnon et al. (2010) wurde im Jahr 2010 ein rekombinantes Virus aus

PCV1 und PCV2 entdeckt, für das der Name PCV1 / 2a vorgeschlagen wurde (Gagnon et al., 2010).

### **2.1. Porcines Circovirus Typ 1 (PCV1)**

Das Porcine Circovirus Typ 1 wird in der Fachliteratur vor allem als Kontaminant von Zellkulturen (Tischer et al., 1974) und humanmedizinischen Impfstoffen erwähnt (Baylis et al., 2011). Den meisten Veröffentlichungen ist zu entnehmen, dass PCV1 für Schweine apathogen ist (Mankertz, 2008, Allan et al., 2012). Zu diesem Thema wurde von Saha et al. (2011) ein Infektionsversuch durchgeführt. Hierbei wurden Schweineföten intrauterin mit PCV1 infiziert, ein Teil der Föten mit dem bekannten PCV1-Stamm CCL 33 und ein anderer Teil mit dem Feldstamm 3384. Bei der Versuchsauswertung konnten bei zwei der mit dem PCV1-Stamm CCL 33 infizierten Föten mit hohen Virustitern Hämorrhagien in der Lunge nachgewiesen werden. Von Saha et al. (2011) wurde daher postuliert, dass PCV1 als pathogen für Schweineföten einzustufen ist. Die Kontamination einer Rotavirus-Vakzine für Kinder gab Anlass zur Diskussion über die Impfstoffsicherheit. Aus diesem Grund wurden auch Versuche bezüglich der Infizierbarkeit menschlicher Zellen mit PCV1 unternommen, einer Forschungsgruppe gelang es, eine subklonierte Zelle humaner Karzinomzelllinien zu infizieren (Beach et al., 2011). Es wird daher nach Methoden gesucht, die Kontamination von Impfstoffen zu vermeiden, bzw. virusbehaftete Impfstoffe erfolgreich zu dekontaminieren (Yang et al., 2013).

### **2.2. Porcines Circovirus Typ 2 (PCV2)**

Zu Beginn des jetzigen Jahrtausends stellte sich heraus, dass das Porcine Circovirus Typ 2 einen Stammbaum an genetisch eng verwandten Untergruppen besitzt. Schon im Jahr 2000 beschrieben Hamel et al. (2000) verschiedene PCV2-Subtypen. Dazu wurden in den Jahren 1997 bis 1999 Gewebeproben von Schweinen (n=1693) mit verschiedenen Krankheitssymptomen aus verschiedenen Regionen Kanadas mittels PCR auf PCV2 untersucht. Im Anschluss wurde die Methode des Restriktionsfragment-längenpolymorphismus (RFLP) durchgeführt. Hierbei konnten die PCR-Amplifikate von 554 Schweinen in fünf verschiedene



PCV2-Subtypen aufgetrennt werden, die Nukleotid-Sequenzen der verschiedenen Isolate waren zu 95 % identisch (Hamel et al., 2000). Hinweise auf das Vorkommen unterschiedlicher Genotypen in verschiedenen Ländern erhielt in etwa zeitgleich die Arbeitsgruppe Fenaux et al. (2000) in Nordamerika. Sie verglichen die Genome von PCV2-Isolaten aus verschiedenen Ländern und stellten Unterschiede fest, die mit der geographischen Herkunft der Isolate assoziiert waren. Die Genomsequenzen zweier Isolate aus Frankreich wichen am meisten von allen anderen ab, stellten einen eigenen Ast des PCV2-Stammbaums dar. Ein taiwanesisches und ein kanadisches Isolat ließ sich den anderen nicht zuordnen. Alle US-amerikanischen Isolate waren eng verwandt, die Kanadischen wichen jedoch in einem gewissen Maß in ihren Genomsequenzen davon ab. Fenaux et al. (2000) bescheinigten den verschiedenen Isolaten des Porcinen Circovirus Typ 2 zwar ein stabiles Genom, dessen Sequenzen jedoch in geographisch unterschiedlichen Regionen variieren können. Enge Verwandtschaften zwischen kanadischen, europäischen und asiatischen Stämmen wurden auch von Larochelle et al. (2002) aus Kanada aufgezeigt. Ebenso wird die geographische Varianz des Virus auch von deutschen Forschern belegt. Die Arbeitsgruppe um Mankertz et al. (2000) vom Robert Koch-Institut zeigte die genetische Verwandtschaft von Isolaten aus PMWS erkrankten Tieren. Verwandt waren die aus Spanien, Deutschland und Frankreich mit Sequenzen aus Kanada und zwei Isolaten aus Taiwan. Nordamerikanische Sequenzen repräsentierten eine eigene Gruppe (Mankertz et al., 2000). Auch Cheung (2007) erörterte, dass bei PCV2 zwei verschiedene Genotypen existieren. Als er aus Gewebeproben akut erkrankter 10 bis 16 Wochen alter Ferkel aus unterschiedlichen Regionen der USA (je zwei betroffene Herden aus Kansas, North Carolina und Iowa) PCV2 isolierte, stellte er die Koexistenz zweier unterschiedlicher Genotypen fest, Gruppe 1 (entspricht PCV2b) und Gruppe 2 (PCV2a). Während PCV2b in allen Ferkeln nachgewiesen wurde, waren für PCV2a nur zwei Tieren positiv.

Nachdem über viele Jahre zahlreiche PCV2-Subtypen beschrieben und für diese verschiedene Benennungen verwendet worden waren, erfolgte im Jahr 2008 eine Vereinheitlichung der Benennungen (Dupont et al., 2008). Von Segales et al. (2008), einem Konsortium internationaler Wissenschaftler, wurde vorgeschlagen, sich bei zukünftigen Veröffentlichungen einer einheitlichen Nomenklatur zu

bedienen, diese lautet PCV2-Genotyp a, b und c. Die Unterscheidung der drei Genotypen erfolgt anhand des ORF2, jener Sequenz, die das Kapsid-Protein des Virus verschlüsselt (Nawagitgul et al., 2000). Der Bereich, in dem sich die Genotypen in ORF2 unterscheiden umfasst nur die Länge von sechs Aminosäuren und wird als „signatur motif“ bezeichnet, die Länge des Gesamtgenoms liegt bei 1768 Nukleotiden für PCV2a und 1767 Nukleotiden für PCV2b (Cheung et al., 2007). Man vergleicht die Sequenzen immer paarweise, das Verfahren wird daher „pairwise sequence comparison“ oder abgekürzt PASC genannt (Segales et al., 2008).

Während Genotyp a insbesondere in Schweine haltenden Betrieben verschiedener Länder in den Jahren 1997 bis 2003 verbreitet war (Allan et al., 2007), kam der Genotyp b vorwiegend ab 2004 bezogen auf PMWS-Ausbrüche in Nordamerika (Gagnon et al., 2007) und in europäischen Ländern (Dupont et al., 2008, Timmusk et al., 2008) vor. Der Subtyp c wurde bis dahin lediglich in drei Virussequenzen aus Dänemark aus den 1980er Jahren nachgewiesen (Dupont et al., 2008, Segales et al., 2008). Darüber hinaus wurde von chinesischen Wissenschaftlern bei der Auswertung von Proben aus PMWS betroffenen Betrieben aus verschiedenen Regionen Chinas aus den Jahren 2004 bis 2008 die Existenz weiterer Genotypen, d und e, postuliert (Guo et al., 2010, Wang et al., 2009), was jedoch von anderen Forschern unter Berücksichtigung der geltenden Regeln für die Einteilung und Benennung von PCV2-Stämmen nicht unterstützt wurde (Cortey et al., 2011).

Bei PCV2 ist neben ORF2 ist das zweite Hauptleseraster der ORF1, in ihm sind die Proteine verschlüsselt, die für die Replikation zuständig sind (Mankertz et al., 1998). Zusätzlich wurde vor einigen Jahren das ORF3 Protein entdeckt, das vermutlich für virusinduzierte Apoptoseprozesse zuständig ist (Liu et al., 2005). Inwieweit die Zugehörigkeit zu einem Genotyp die Virulenz beeinflusst, konnte noch nicht endgültig geklärt werden (Trible und Rowland, 2012).

Zur weiteren Unterteilung der Genotypen PCV2a und PCV2b wurde von Olvera et al. (2007) für diese Untergruppen der Begriff „Clades“ etabliert. Für PCV2a existieren demnach fünf Clades, 2A, 2B, 2C, 2D und 2E. Für PCV2b gibt es die drei Clades 1A, 1B und 1C (Olvera et al., 2007).

In China wurde bei der Auswertung von PCV2-Stämmen aus Betrieben mit

PMWS-Problematik vier verschiedene Mutationen entdeckt, darunter ein Stamm mit zwei zusätzlichen Basen in ORF2 (Guo et al., 2010). Aufgrund anschließender Infektionsversuche mit der neuen Virusvariante wird von den Autoren eine, im Vergleich zu bekannten PCV2a und PCV2b-Stämmen, erhöhte Virulenz vermutet (Guo et al., 2012). Auch in den USA wurde im Jahr 2012 auf einem schweinehaltenden Betrieb, in dem eine PCV2-Vakzinierung durchgeführt wurde, ein PCV2b Stamm isoliert, der vorher in Amerika unbekannt war. Man fand heraus, dass dieser Stamm zu 99,9% mit jenem stark virulenten Stamm aus China verwandt war (Opriessnig et al., 2013b). Dass ähnliche Stämme auch in Europa zu finden sind, haben Savic et al. (2012) bewiesen. Hier wurden im Rahmen einer Studie bei PMWS betroffenen Tieren PCV2-Virusstämme des Genotyps b vom Subtyp 1C entdeckt, die zu chinesischen Stämmen eng verwandt schienen (Savic et al., 2012). Auch Koinfektionen mit verschiedenen PCV2-Genotypen im selben Tier kamen vor, wie unter anderem in einer amerikanischen Studie aus dem Jahr 2013 in einer Herde gezeigt werden konnte. In einem Bestand, waren 76,6 % der ausgewerteten Proben sowohl PCV2a als auch PCV2b positiv (Gerber et al., 2013). Auch bei einer Studie aus China wurden verschiedene Genotypen von PCV2 im selben Schwein gefunden (Chiou et al., 2012). Dass dasselbe Phänomen auch bei Wildschweinen vorkommt, zeigten Reiner et al. aus Deutschland (Reiner et al., 2011). In einer Studie aus China wurden klinisch kranke Tiere und Tiere ohne Krankheitssymptome auf PCV2 untersucht. Man fand heraus, dass bei 32% der PCV2-Positiven und klinisch erkrankten Tiere verschiedene Genotypen gleichzeitig nachgewiesen werden konnten, hingegen 0% bei klinisch gesunden Tieren. Die Autoren vermuteten, dass die Koexistenz verschiedener Subtypen in einem Tier zu Entwicklung stärkerer klinischer Symptome führen könnte (Zhai et al., 2011).

### **2.3. Vorkommen der Genotypen PCV2a und PCV2b**

Epidemiologische Daten bestätigen eine weltweite Veränderung des Aufkommens der beiden PCV2-Hauptgenotypen von PCV2a in Richtung PCV2b (Rose et al., 2012) der vorherrschende Genotyp des porcinen Circovirus Typ 2 ist derzeit PCV2b (Opriessnig et al., 2013a). Bei einer Prävalenzstudie bezüglich der Genotypen von PCV2 wurden von Chiou et al. (2012) in China PCV2-Isolate aus den Jahren 2002 bis 2011 analysiert. Es wurden Organproben von abgesetzten

Ferkeln und Tieren vor Mastbeginn aus verschiedenen Regionen Taiwans untersucht. Die Tiere waren durch Krankheitszeichen wie Kümern, Atemnot oder Ikterus aufgefallen. Es wurde festgestellt, dass es sich bei den Isolaten aus den Jahren vor 2007 um PCV2a- und PCV2b-Stämme handelte. Hingegen konnte bei später gewonnenen Proben nur noch der Genotyp b gefunden werden.

Bei der Sequenzanalyse von PCV2b-Isolaten derselben Betriebe aus aufeinanderfolgenden Jahren wurde herausgefunden, dass sich der genetische Aufbau der Sequenz im Bereich des ORF2 verändert hatte. Da in ORF2 das Kapsidprotein, das Hauptstrukturprotein des Virus codiert ist, spielt diese Veränderung für die Immunantwort des Wirtsorganismus eine wichtige Rolle. Von Chiou et al. (2012) wurde vermutet, dass schon wenige Mutationen in diesen Bereichen eine erhebliche Steigerung der Pathogenität des Virus ergeben können (Chiou et al., 2012). Von Cheung und Greenlee (2011) wurde im Jahr 2011 eine Studie veröffentlicht, in der festgestellt worden war, dass sich PCV2b in Nierenzellkulturen besser reproduzieren kann, als PCV2a. Diese im Vergleich beider Genotypen bessere Reproduktionsfähigkeit des Genotyps b könnte mit zur Erklärung der Abnahme von PCV2a und Zunahme des Genotyps b beitragen (Cheung und Greenlee, 2011). Jedoch herrscht bezüglich der Ursachen für das derzeitige Vorherrschen von PCV2b bei gleichzeitiger Abnahme von PCV2a noch keine Klarheit. Auch von Opriessnig et al. (2008b) wurde die Existenz eines noch nicht erforschten, beeinflussenden Faktors für möglich gehalten, der die Replikation von PCV2b bei gleichzeitiger Steigerung der Schwere der Erkrankung spezifisch fördert (Opriessnig et al., 2008b).

### **2.4. PCV2 in Deutschland**

Obwohl Erkrankungen durch das Porcine Circovirus Typ 2 erstmals in den 1980er Jahren beobachtet wurden, muss man davon ausgehen, dass es auch schon vor diesem Zeitpunkt in den weltweiten Schweinepopulationen vorhanden war. Dies belegt eine retrospektive Studie von Jacobsen et al. (2009). Hierfür wurde Material, das bei der Sektion von Schweinen in Norddeutschland in den Jahren 1961 bis 1998 archiviert wurde, untersucht. Aus insgesamt 18855 Proben wurden unter Berücksichtigung der Kriterien Alter (zwischen 4 und 16 Wochen) und

Gewicht (unter 50 kg) zufällig 445, dies entspricht ungefähr 10 bis 21 Tieren pro Jahr, ausgesucht. Außerdem waren von den ausgewählten Tieren Krankheitssymptome wie Lymphknotenvergrößerung, Lymphozytendepletion in lymphatischen Geweben, interstitielle Pneumonien sowie interstitielle Nephritiden bekannt. Bei der Untersuchung der Gewebeproben mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) ergab sich in den Jahren 1961 bis 1984 ein Durchschnitt von 2,77 %, von 1985 bis 1998 ein Durchschnitt von 32,14% PCV2-positiver Tiere. Mithilfe der PCV2 spezifischen PCR konnten erst ab dem Jahr 1985 relevante Amplifikate erzeugt werden. Nach Angaben der Autoren könnte durch die lange Aufbewahrung die DNA beschädigt worden sein (Jacobsen et al., 2009). Die bei der In-situ-Hybridisierung detektierten Porcinen Circoviren ab dem Jahr 1962 konnten mithilfe eines weiteren PCR-Primerpaares bestätigt werden. Bei der Auswertung wurde festgestellt, dass PCR-Amplifikate aus den Jahren 1962 und 1967 zu 98 bzw. 100% aktuellen in der Gendatenbank gelisteten Isolaten glichen (GenBank accession number AF027217 und GenBank accession number EU158773) (Jacobsen et al., 2009). In einer weiteren Studie aus Deutschland wurden in den Jahren 1999 bis 2001 Lungenproben und Inguinallymphknoten von 304 Schweinen mit unterschiedlicher Krankheitsgeschichte aus 156 bayerischen Betrieben mittels PCR auf PCV2 untersucht. 61% der Tiere waren in beiden Proben PCV2-positiv. Auffällig war, dass das Virus häufiger in Betrieben mit Tieren verschiedener Herkünfte nachzuweisen war, als in geschlossenen Betrieben (Ritzmann M., 2002). Parallel zur Zunahme der PCV2 positiven Tiere in Deutschland in den 90er Jahren des letzten Jahrtausends wurden international die ersten Erkrankungsausbrüche bei Schweinen registriert, die von dem Virus mit verursacht wurden (Allan und Ellis, 2000). Dass PCV2 aktuell auch in der Wildschweinpopulation Deutschlands weit verbreitet ist, haben Reiner et al. (2010), zeigen können. Sie wiesen nach, dass 45,4% Prozent der landesweit mittels q-PCR getesteten Wildschweine PCV2 positiv waren. Dies ist auch insofern bedeutsam, da eine Verbreitung von Erregern durch Wildschweine aufgrund ihrer wachsenden Population nicht auszuschließen ist (Hammer et al., 2012). Von Reiner et al. (2010) wurden in den Jahren 2004 bis 2007 Gewebeproben 531 jagdlich erlegter Wildschweine aus 46 verschiedenen Jagdgebieten in Deutschland, verteilt auf 14 deutsche Bundesländer gesammelt. Die Proben wurden aus Tonsillen, Lungen und Milzen entnommen. Des Weiteren

wurden Schlachtkörperproben von 308 gesunden und 40 vorerkrankten Hausschweinen aus 12 deutschen Bundesländern untersucht. Dabei wurden 80% der Proben aus Spanferkelschlachtkörpern und 20% aus Mastschweinschlachtkörpern bezogen. Von den beprobten Hausschweinen wurde mittels q-PCR bei 98,8% und bei Wildschweinen 45,4% porcines Circovirus Typ 2 nachgewiesen (Reiner et al., 2010). In einer weiteren Untersuchung im Jahr 2011 wurden von Reiner et al. (2011) einige der vorher gewonnenen PCV2-positiven Proben einer auf ORF2 und ORF3 basierenden Genomsequenzierung unterzogen. Dazu wurden 40 Wildschweinproben und 60 Proben aus den geschlachteten Hausschweinen zufällig ausgewählt. Bei der Sequenzierung stellte sich heraus, dass entsprechend der aktuell verwendeten Nomenklatur (Segales et al., 2008) in 60% der Wildschwein- aber nur 4,8% der Hausschweinproben der Genotyp PCV2a zu finden war. Der Genotyp PCV2b konnte bei 70% der Wildschweinproben und 98,4% der Hausschweinproben diagnostiziert werden. Bei 27% der Wildschwein- und rund 4% der Hausschweinproben konnten sowohl PCV2a als auch PCV2b gefunden werden (Reiner et al., 2011). In einer weiteren Studie aus Deutschland von Hammer et al. (2012) wurden Wildschweine, neben anderen Untersuchungen, auch auf PCV2 getestet. Dazu wurden im Jahr 2008 und 2009 Gewebeproben von 203 jagdlich erlegten Wildschweinen aus Baden-Württemberg auf PCV2 getestet, 103 (Prävalenz von 50,7%) davon waren in der qPCR positiv (Hammer et al., 2012). Zur Veranschaulichung des PCV2 Verbreitungsgrades in Deutschland kann auch eine von Schmoll et al. (2008) im Jahr 2008 durchgeführte deutsch/österreichische Studie zur Erhebung der Verbreitung von PCV2 bei Besamungssebern in einem Alter von 8 bis 32 Monaten herangezogen werden. Es wurden insgesamt 716 Eber eingeschlossen, 272 davon in Deutschland. Von 472 Ebern wurden Spermaproben mittels Nested PCR (nPCR) auf PCV2 getestet, 86 (18,2%) davon positiv (Schmoll et al., 2008).

### **2.5. PCV2-assoziierte Erkrankungen**

PCV2 kann durch oronasalen Kontakt sowie durch Harn und Faeces übertragen werden (Bolin et al., 2001). O'Connor et al. (2001) isolierten Virus in verändertem Gewebe togeborener Feten, was eine intrauterine Übertragung des Virus vermuten lässt. Auch von deutschen Wissenschaftlern wird die intrauterine

Übertragung von PCV2 angenommen (Ritzmann M., 2002). Eine weitere Arbeitsgruppe fand heraus, dass Läsionen bei Neonaten mit hoher PCV2-Viruslast assoziiert sind (Brunborg et al., 2007). Die genaue Pathogenese von PCV2-assoziierten Erkrankungen ist noch nicht endgültig geklärt. Opriessnig et al. (2007) beschrieben verschiedene Faktoren, die Einfluss auf den Infektionsverlauf haben können. Zu nennen ist dabei das Vorkommen unterschiedlicher PCV2-Isolate, Koinfektionen, Immunstatus des jeweiligen Tieres bzw. dessen Anfälligkeit. Schließlich kommt es zum Befall lymphatischer Gewebe und in zerstörten Lymphfollikeln zum Ersatz von Lymphozyten durch PCV2 befallene Makrophagen und dendritische Zellen, es kann je nach Höhe der Virämie zu einer Serokonversion kommen und letztlich eine klinische oder subklinische Erkrankung entstehen (Opriessnig et al., 2007). Die durch PCV2 hervorgerufenen Erkrankungskomplexe wie Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) und Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrom (PDNS), können unter Porcine Circovirus Diseases (PCVD) (Segales et al., 2005a) oder PCV-Associated Diseases (PCVAD) (Opriessnig et al., 2007) zusammengefasst werden. Einer aktuellen Einteilung folgend unterscheidet man bei den PCVD die PCV2 subclinical infection (PCV2-SI), Porcine Circovirus 2 Systemic disease (PCV2-SD), PCV2 lung disease (PCV2-LD), PCV2 enteric disease (PCV2-ED) und PCV2 reproductive disease (PCV2-RD). Der Begriff des Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) wird aufgrund seiner nicht eindeutig geklärten Ätiologie beibehalten (Segales, 2012).

### **2.5.1. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS)**

Ein von PCV2 ausgelöstes Syndrom des Kümmerens bei Schweinen wurde erstmals in den 1990er Jahren, sowohl in den USA, als auch europäischen Schweinebeständen beschrieben (Allan et al., 1998b). Die Erkrankung erhielt den Namen „Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome“ (PMWS) (Allan und Ellis, 2000). Die klinischen Erscheinungen des PMWS werden durch zusätzliches Einwirken anderer Erreger auf den Organismus begünstigt. Vorwiegend betroffen sind Absetzferkel und Tiere in der Vormast, jedoch auch Tiere zu Beginn der Mastperiode, im Wesentlichen also Tiere im Alter zwischen 7 und 15 Wochen (Harding, 2004). Von allen PCV2-assoziierten Erkrankungen verursacht das

PMWS den größten wirtschaftlichen Schaden in der Schweineproduktion (Segales et al., 2005a). Studien bezüglich PMWS ergaben im Wesentlichen sechs Leitsymptome des Erkrankungskomplexes, die für klinische Diagnostik hilfreich sind: Kümmeren, Atemnot, vergrößerte Lymphknoten, Diarrhoe, Blässe und Ikterus (Harding, 2004). Darüber hinausgehende Symptome sind in der Literatur seltener zu finden, z.B. wurde in einer niederländischen Studie Meningitiden in Assoziation mit PMWS beobachtet (Wellenberg et al., 2000). In der Pathohistologie werden bei PMWS granulomatöse Entzündungen vor allem in den lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Peyer'schen Platten gefunden (Chae, 2004). Typische klinische Symptome zusammen mit entsprechenden Läsionen, in denen PCV2 nachgewiesen werden kann, sind anerkannte Kriterien für die PMWS-Diagnostik (Quintana et al., 2001). Außerdem hängt die Schwere der klinischen Erscheinungen auch mit der Höhe der Viruslast im Serum bzw. in den betroffenen Organen der erkrankten Schweine zusammen (Olvera et al., 2004). Brunborg et al. (2004) gaben als kritischen Wert für das klinische PMWS einen Wert von  $10^6$  bis  $10^7$  PCV2-Genomkopien pro Milliliter Serum an (Brunborg et al., 2004). Auch Begleiterkrankungen haben Einfluss auf die Schwere der Erkrankung. So stellten z.B. Allan et al. (2000) fest, dass die gleichzeitige Infektion von Ferkeln mit PCV2 und Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) die Vermehrung des PCV2-Virus im Tier im Vergleich zu alleiniger Infektion mit PCV2 potenzierte (Allan et al., 2000). Krakowka et al. (2000) stellten in einem Tierversuch fest, dass ihre Versuchstiere bei alleiniger Infektion mit PCV2 nicht erkrankten, jedoch führte die gleichzeitige Infektion von PCV2 und Porcinem Parvovirus (PPV) zu schweren klinischen Erscheinungen (Krakowka et al., 2000). Alarcon et al. (2011), die sich mit beeinflussenden Faktoren für die Schwere eines PMWS auseinandersetzten, fanden heraus, dass Tiere, die auf *Mycoplasma hyopneumoniae* serologisch positiv getestet wurden schwerer erkrankten, als Seronegative (Alarcon et al., 2011).

### **2.5.2. Porzines Dermatitis und Nephropathie Syndrome (PDNS)**

Das „Porcine dermatitis and nephropathy syndrome“ (PDNS) beruht auf einer immunvermittelten Gefäßerkrankung, die erstmals in den 1990er Jahren in



England beschrieben wurde (Smith et al., 1993, White und Higgins, 1993). Charakteristisch für PDNS ist eine systemische Vaskulitis mit dermalen und epidermalen Nekrosen sowie nekrotisierende Glomerulonephritis (Opriessnig et al., 2007). Die Nieren fallen adspektorisch durch Vergrößerung auf, häufig sind Petechien auf der Oberfläche erkennbar (Harding, 2004). Mikroskopisch findet man in den Wänden von Blutgefäßkapillaren und Nierenglomeruli Ablagerungen von Immunkomplexen (Harding, 2004). Es können Glomerulonephritiden mit chronischen Veränderungen der Nierenglomeruli auftreten (Majzoub M., 2005). Es werden multifokale Hautverfärbungen von rot bis schwarz, vorwiegend an der Hinterhand beschrieben (Opriessnig et al., 2007), die sich dann auf Thorax, Flanken und Ohren ausbreiten können (Harding, 2004). Petechiale bis flächenhafte Blutungen, vor allem der Hintergliedmaßen und Ohren werden ebenfalls beschrieben (Ritzmann M., 2005). In leichten Fällen können die Tiere ohne Ausbildung weiterer klinischer Symptome genesen. Stark betroffene Tiere können jedoch Lahmheiten, Anorexie, Gewichtsverlust und Fieber entwickeln. Selten kommen plötzliche Todesfälle vor (Harding, 2004). In englischen und schottischen Betrieben wurden ab dem Jahr 1993 von Thomson et al. (2002) eine Studie bei PDNS erkrankten Schweinen durchgeführt. Fälle mit ausgeprägten Hautläsionen endeten in dieser Studie immer tödlich. Im Labor wurden Proteinurie und veränderte Nierenwerte diagnostiziert. In der Sektion war die bilaterale Vergrößerung des Nierenkortex der auffallendste und am häufigsten festgestellte Befund. Histologisch zeigten die Hautläsionen eine hämorrhagische Dermatitis mit nekrotisierender Entzündung der Gefäße in der oberflächlichen Dermis und fibrinöser Nekrose tiefergelegener Arteriolen. Die Nierenveränderungen reichten von akuten Glomerulitiden bis hin zu chronisch sklerotisch veränderten Glomeruli, interstitieller Entzündung und Fibrose (Thomson et al., 2002). Von anderen Autoren wurden ebenfalls systemische Vaskulitiden mit dermalen und epidermalen Nekrosen sowie nekrotisierende und fibrinöse Glomerulonephritiden beschrieben (Opriessnig et al., 2007). Autoren wie Segales et al. (2005a) sahen es als noch nicht endgültig erwiesen an, dass PCV2 als sichere Ursache für PDNS anzusehen ist. Die klinischen Erscheinungen des PDNS sind von der Frühform der Klassischen Schweinepest schwer zu unterscheiden (Majzoub M., 2005). Daher muss diese Differentialdiagnose immer ausgeschlossen werden (Ritzmann M., 2005).

### **2.5.3. Reproduktionsstörungen (Reproductive failure)**

Reproduktionsstörungen wie Aborte, Totgeburten oder das Auftreten von Mumien ist ein häufiges, jedoch nicht konstant auftretendes Phänomen im Zusammenhang mit PMWS-Ausbrüchen (Harding, 2004). West et al. (1999) beschrieben Ende der 1990er Jahre erstmals mit PCV2 in Verbindung gebrachte Reproduktionsfehler. Auf einem Vermehrbetrieb mit 450 Jungsauen war es vermehrt zu Totgeburten und verfrühter Anbildung des Gesäuges bei den Sauen mit anschließend zeitverzögerter Geburt mumifizierter Ferkel gekommen. Bei einem abortierten Fötus fand man verschiedene Organläsionen und konnte in darin immunhistochemisch PCV2 nachweisen. Man kam zu dem Ergebnis, dass die Infektion mit PCV2 in utero zum Abort führen kann, die subletale Infektion hingegen möglicherweise im späteren Leben zur klinischen Manifestation von PMWS führt (West et al., 1999). Von O'Connor et al. (2001) wurde in den späten 1990er Jahren ebenfalls eine intrauterine PCV2-Infektion von Föten postuliert. In der Studie beobachteten die Wissenschaftler einen zuvor PCV2-positiv getesteten Ferkelerzeugerbetrieb mit 3000 Sauen aufgrund starken Anstiegs totgeborener und mumifizierter Ferkel sowie Anstieg der Jungtiersterblichkeit. Bei der Untersuchung der totgeborenen Tiere fielen Herzveränderungen auf, mithilfe immunhistochemischer Färbungen und PCR-Untersuchungen konnte PCV2-Virus im Myocard- und anderen Geweben nachgewiesen werden (O'Connor et al., 2001).

### **2.5.4. Enteritis (Enteric disease)**

Kim et al. (2004) beschrieben im Jahr 2004 eine Erkrankung beim Schwein, die unabhängig von der PMWS-Symptomatik aufgetreten war. Die Schweine litten unter Diarrhoe bei granulomatöser Enteritis. Insbesondere die Peyer-Platten, waren betroffen, die Schleimhaut war im Bereich des Dünndarms von großen Mengen Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen infiltriert, gleichzeitig wurden hohe PCV2-Mengen aus den betroffenen Geweben isoliert (Kim et al., 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden von Chae (2005) beschrieben, betroffene Schweine litten an antibiotikaresistentem Durchfall und blieben im Wachstum

zurück. Histologisch wurde eine granulomatöse Entzündung von Dünn- und Dickdarm beobachtet, es fielen Infiltrate von Epitheloid- und mehrkernigen Riesenzellen in diesen Geweben auf. In Riesenzellen und Histiozyten innerhalb der Peyer-Platten konnte mittels In-situ-Hybridisierung PCV2 nachgewiesen werden. In anderen Organen konnten mikroskopisch keine Läsionen nachgewiesen werden (Chae, 2005). Von Opriessnig et al. (2011b) wurde ein Versuch durchgeführt, in dem typische PCV2-assoziierte Gewebsveränderungen wie lymphohistiozytäre Enteritis und Peyer-Platten Depletion hervorgerufen werden konnten. Zudem konnten in diesen Läsionen große Mengen PCV2 nachgewiesen werden. Die Schweine entwickelten PCVAD mit Durchfall, verringerten Tageszunahmen und Gewichtsverlust zwischen dem 14. und 28. Tag *post infectionem* (Opriessnig et al., 2011b).

### **2.5.5. PCV2-assoziierte Atemwegserkrankungen**

Nach Opriessnig et al. (2011a) ist PCV2 neben nichtinfektiösen Faktoren und anderen Viren und Bakterien einer der Faktoren, die beim Schwein zu Atemwegserkrankungen führen, die unter dem Begriff „Porcine Respiratory Disease Complex“ (PRDC) zusammengefasst werden. PCV2 kann in Verbindung mit anderen Noxen zu ernsthaften Erkrankungen der Atemwege führen (Opriessnig et al., 2011a). Cheng et al. (2011) stellten im Jahr 2011 bei chronisch an PMWS erkrankten Schweinen Symptome fest, wie sie auch bei einer aus der Humanmedizin bekannten, chronische Atemwegserkrankung auftreten. Die Pathogenese dieser sogenannten „Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia“ (BOOP) ist noch nicht komplett geklärt (Cheng et al., 2011). Wellenberg et al. (2010) stellten im Jahr 2010 fest, dass Schweine im Alter von 10 bis 24 Wochen, auch in Herden ohne hoher PMWS-Prävalenz, an PCV2-assoziierten Lungenerkrankungen leiden können (Wellenberg et al., 2010). In einer Veröffentlichung von Segales (2012) wurden diese Krankheiten unter dem Begriff Atemwegserkrankung „respiratory disease“ (RD) zusammengefasst. Ein anderer Erkrankungstyp wird als Proliferative und Nekrotisierende Pneumonie „proliferative and necrotizing pneumonia“ (PNP) (Segales, 2012) bezeichnet. Zum Letztgenannten wurde von Szeredi und Szentirmai (2008) im Jahr 2008 eine Studie durchgeführt, deren Befunde für eine ursächliche Beteiligung von PCV2 an

der PNP-Erkrankung sprechen. Darüber hinaus stellten sie fest, dass das Gefäßsystem eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von PCV2-assoziierten Erkrankungen spielt (Szeredi und Szentirmai, 2008). Auch von Grau-Roma und Segales (2007) gibt es zu diesem Thema eine Publikation aus dem Jahr 2007. Im Vergleich mit anderen an der PNP-Erkrankung beteiligten Viren hatte PCV2 die höchste Prävalenz. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, dass PCV2 das wichtigste ätiologische Agens für die Auslösung der PNP in Spanien darstellt. Sie vermuteten, dass PCV2 sogar europaweit die Hauptrolle für PNP-Erkrankung spielen könnte (Grau-Roma und Segales, 2007). Eine typische Läsion für PCV2-assoziierte Lungenerkrankungen ist die peribronchioläre fibröse Hyperplasie, im betroffenen Gewebe konnten häufig große Virusmengen nachgewiesen werden (Opriessnig und Langohr, 2013).

### **2.5.6. Subklinische PCV2-Infektion**

Die ersten PCV2-Infektionen konnten beim Schwein schon im Jahr 1962 nachgewiesen werden (Jacobsen et al., 2009). PCV2 ist weltweit in Schweinepopulationen verbreitet (Segales et al., 2005a), viele Tiere sind subklinisch infiziert (Segales, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass sich die subklinische Infektion ungünstig auf den Erfolg von Impfmaßnahmen auswirken kann (Opriessnig et al., 2006). In einer aktuellen Studie aus England wird herausgestellt, dass die subklinische PCV2-Infektion erhebliche wirtschaftliche Schäden verursacht (Alarcon et al., 2013).

## **3. Diagnostik**

Zur Diagnostik von PCV2 stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Es gibt sowohl Methoden des direkten Virusnachweises, als auch die des Antikörpernachweises. Insbesondere in den letzten Jahren wird häufig die PCR zum DNA-Nachweis in Geweben den herkömmlichen Methoden der Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung vorgezogen (Opriessnig und Langohr, 2013).

### **3.1. PCV2 Genomnachweis**

#### **3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zum Nachweis viraler DNA hat sich die PCR in den letzten Jahren zur Standarduntersuchungsmethode für PCV2 entwickelt. Sie wird anderen, wie z.B. immunhistochemischen Untersuchungsmethoden unter anderem aufgrund des hohen Automatisierungsgrads, der Kostenersparnis und schneller Erlangung der Ergebnisse vorgezogen (Opriessnig und Langohr, 2013). PCV2 kann mit der Methode aus diversen Organen und Sekreten nachgewiesen werden (Hamel et al., 2000). Da PCV2 in Schweinebeständen sehr weit verbreitet ist und klinische Erscheinungen mit der Virusmenge im Tier zusammenhängen, hat dessen qualitativer Nachweis eine zu geringe Aussagekraft, es sind quantitative Verfahren notwendig (Brunborg et al., 2004). Auch weil die PMWS assoziierten Läsionen im Tier mit der Virusmenge korrelieren, ist eine Quantifizierung sinnvoll für die PMWS-Diagnostik (Rovira et al., 2002). Bei der real-time PCR (rt-PCR) wird die Menge der Amplifikate während des Laufs der Untersuchung, also in Echtzeit durch Fluoreszenzmessung ermittelt, nicht am Ende, wie bei der herkömmlichen PCR (Mackay et al., 2002). Um Aussagen über die Anzahl der vorhandenen Virusgenomkopien treffen zu können, werden die PCV2-haltige Proben zusammen mit einer standardisierten Verdünnungsreihe in Reaktion gebracht, die Quantität kann dann errechnet werden (Segales et al., 2005b). Die Multiplex Real-Time PCR wird verwendet, um mehrere Genomabschnitte gleichzeitig in einer PCR-Reaktion nachzuweisen (Mackay et al., 2002). Dieses Verfahren wurde von Opriessnig et al. (2010) eingesetzt, um eine Unterscheidung der PCV2-Genotypen a und b zu ermöglichen. Da sich PCV2a und PCV2b im Bereich des Viruskapsids unterscheiden, konnten für diese Untersuchung zwei spezifische Sonden zur Unterscheidung von PCV2a und PCV2b entwickelt werden (Opriessnig et al., 2010). Für die Vorbereitung einer Vollsequenzierung des PCV2 Genoms muss ebenfalls eine PCR durchgeführt werden. Gagnon et al. (2007) verwendeten einen Doppelansatz mit verschiedenen Oligonukleotiden, um zwei sich überlappende PCR-Produkte zu erhalten, die zusammen das Kompletengenom ergeben .

### **3.1.2. In-situ-Hybridisierung (ISH)**

Die Methode kann für die Detektion von DNA oder RNA in fixiertem Gewebe eingesetzt werden. Sie wurde von Jacobsen et al. (2009) verwendet, um archivierte, formalinfixierte oder in Paraffin eingebettete Gewebeproben ab dem Jahr 1961 auszuwerten. Dabei wird das betroffene Gewebe zunächst entwachst und mit pyrogenfreiem Wasser gewaschen. Es folgt ein proteolytischer Verdau und einige weitere Schritte, ehe unter Wärmezufuhr die Hybridisierung erfolgt. Dabei bindet eine Sonde an die nachzuweisende Genomsequenz, diese wird mit einem Farbstoff sichtbar gemacht (Seeliger et al., 2007). Die In-situ-Hybridisierung wurde zur PCV2-Diagnostik asservierter Proben auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt. Choi und Chae (1999) untersuchten in Formalin fixierte Gewebeproben von Schweinen, die an PMWS erkrankt waren erfolgreich mit dieser Technik. Ebenso wurden von McNeilly et al. (1999) Proben ausgewertet, die vorher bis zu 6 Monate in Formalin aufbewahrt worden waren. Nach Calsamiglia et al. (2002) ist zwar die PCR bei der PCV2-Diagnostik von Lymphknotengewebe die sensitivste Methode, jedoch korreliert der ISH-Nachweis von PCV2 besser mit den typischen Läsionen, die bei PMWS auftreten.

### **3.2. Antikörpernachweis**

#### **3.2.1. Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)**

Mit der Methode ist es einerseits möglich Antikörper, andererseits Bestandteile von Antigen nachzuweisen. Dabei werden Platten eingesetzt, die mit einer Substanz beschichtet sind, die zur gesuchten komplementär ist (Antigen-Antikörperreaktion). Bei der PCV2-Diagnostik stehen inzwischen ELISA-Methoden zur Verfügung, die zwischen verschiedenen Antikörperklassen unterscheiden können. Es kommen dabei Platten zum Einsatz, die mit Antikörpern beschichtet sind, die spezifisch an Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) des Schweins binden. Ein solcher IgG/IgM ELISA wurde bei einer Studie in Deutschland eingesetzt, erwies sich jedoch in dieser Studie im Vergleich zu einem einfachen IgG Test Kit als weniger zuverlässig. Es wurden damit nur halb so viele Tiere positiv für PCV2-Antikörper getestet (Hammer et al., 2012). Ein ELISA für die Diagnostik von PCV2-Antikörpern kann auf verschiedenen

Virusbestandteilen basieren. Nawagitgul et al. (2002) entwickelten zwei verschiedene Assays, eins davon basierte auf einem in Zellkulturen angezüchteten PCV2-Stamm, das andere auf dem ORF2-Protein von PCV2. Beide erzielten eine gute Sensitivität und Spezifität.

#### **4. Vakzinierung gegen PCV2**

Die derzeit verfügbaren Impfstoffe gegen PCV2 basieren ausschließlich auf Genotyp a und werden als wirksam für beide Genotypen eingestuft (Opriessnig et al., 2007). Derzeit sind in Deutschland vier kommerzielle Impfstoffe zur Vakzinierung gegen PCV2 erhältlich. Davon sind drei für die aktive Immunisierung von Ferkeln und einer zur aktiven Immunisierung von Sauen und Ferkeln zugelassen. Die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe sind Tabelle 1 zu entnehmen. Folgende Impfschemata finden nach Angaben der Hersteller Anwendung:

##### **Ferkelimpfung**

Die PCV2 Impfung von Ferkeln kann als *one shot* Applikation (einmalige Impfung ab einem Alter von drei Wochen) oder als *two shot* Vakzinierung (erste Impfung zwischen Lebenstag drei und fünf, zweite Impfung zwei bis drei Wochen später) erfolgen.

##### **Sauenimpfung**

Die Vakzinierung der Sauen erfolgt nach folgendem Schema:

##### **Grundimmunisierung**

Jungsauen: Jungsauen erhalten zwei Impfungen im Abstand von drei bis vier Wochen, wobei letztere spätestens vier Wochen vor dem Belegen erfolgt, sowie eine dritte Vakzinierung spätestens zwei Wochen vor dem Abferkeltermin

Sauen: Sauen erhalten zwei Impfungen im Abstand von drei bis vier Wochen, letztere spätestens zwei Wochen vor dem Abferkeltermin.

##### **Wiederholungsimpfungen**

Eine Impfung zwei bis vier Wochen vor dem Abferkeln.

Tabelle 1: PCV2-Vakzinen

Name	Zulassungsinhaber	Anwendung
Circovac®	Merial, 29 Avenue Tony Garnier, F-69007 Lyon, Frankreich	Vakzinierung von Ferkeln ab einem Alter von 3 Wochen, Vakzinierung von Sauen
Ingelvac® CircoFLEX™	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, 55216 Ingelheim/Rhein, Deutschland	Vakzinierung von Schweinen (Ferkeln) ab einem Alter von 2 Wochen
Porcilis® PCV	Intervet International BV, Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxmeer, Niederlande	Vakzinierung von Ferkeln, <i>one shot</i> (Alter 3 Wochen) oder <i>two-shot</i> (3.-5. Lebenstag und 2-3 Wochen später)
Suvaxyn® PCV	Zoetis Belgium SA, Rue Laid Burniat 1, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgien	Vakzinierung von Schweinen (Ferkel) ab einem Alter von 21 Tagen

In einer von Velasova et al. (2013) veröffentlichten Feldstudie wurden über die Jahre 2008 bis 2010 50 schweinehaltende Betriebe in England beobachtet, in denen PMWS auftrat. Als Parameter wurde vor allem die Schwere der dort vorkommenden PMWS-Erkrankungen vor und nach der Impfung herangezogen. 90% der Betriebe waren vor der PCV2-Vakzinierung in der PCR-Untersuchung positiv auf PCV2 getestet worden. Der Wert hatte sich beim zweiten Test nach der Impfung, 331 bis 539 Tage nach dem Erstbesuch, auf 56% reduziert (Velasova et al., 2013). Auch eine Studie aus den USA belegte die gute Wirksamkeit der PCV2-Vakzinierung. Hier wurde bei geimpften Tieren eine signifikant niedrigere Mortalitätsrate und signifikant höhere durchschnittliche Gewichtszunahmen in der Endmast festgestellt (Horlen et al., 2008). In einer Studie von Kixmüller et al. (2008) aus Deutschland zur Überprüfung des Impfstoffes, der PCV2-ORF2 exprimierendes Bakulovirus enthält, konnte dessen hohe protektive Wirkung gezeigt werden. In der beobachteten Herde konnte eine Phase der akuten und eine Phase der chronischen Virämie beobachtet werden. Insbesondere in der Akutphase im Alter der Tiere von 11 bis 16 Wochen zeigte die Placebo-Gruppe sehr hohe Virämien ( $>10^6$  Genomäquivalente/ml). Unter Impfschutz war die Dauer der Virämie und die Viruslast signifikant geringer (Kixmüller et al., 2008). In einer anderen Studie aus Deutschland von Haake et al. (2014) überprüfte man



verschiedene Impfzeitpunkte hinsichtlich ihres Erfolgs. Beim Vergleich von Lebenswoche 1 und Lebenswoche 3 als Impfzeitpunkt für die Ferkel stellte sich der spätere Termin als wesentlich günstiger heraus. Die Tiere zeigten im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe höhere Gewichtszunahmen und bei einer PCV2-Infektion signifikant niedrigere Virämien (Haake et al., 2014).

Dennoch wird die Frage, ob ein Impfstoff, der auf Subtyp a-Isolaten basiert, gleichermaßen guten Schutz gegen a- und b-Stämme bietet in mehreren Forschungsprojekten diskutiert. In einer experimentellen Studie aus den USA aus dem Jahr 2008 wurde die Kreuzprotektion zwischen PCV2a und PCV2b unter Verwendung verschiedener PCV2-Isolate bestätigt (Opriessnig et al., 2008b). Ebenso in einer spanischen Studie, hier wurden unterschiedliche Virusstämme aus Spanien, den USA und Kanada sowie aus den Niederlanden getestet, es konnte gezeigt werden, dass durch die Impfung die Ausscheidung von PCV2 im Nasensekret und Kot reduziert wird und eine Virämie verhindert wird (Fort et al., 2008). Es wurde außerdem von Opriessnig et al. (2014) die Wirksamkeit drei kommerzieller Impfstoffe bei der Infektion mit mutierten PCV2-Stämmen (mPCV2) getestet, die im Verdacht stehen PCVAD in PCV2 Impfbetrieben zu verursachen. Dazu wurden Ferkel, die bereits mit einem PCV2b Stamm vorinfiziert waren, zusätzlich mit dem mutierten Stamm infiziert. Es wurde festgestellt, dass alle Vakzinen eine gute protektive Wirkung aufwiesen (Opriessnig et al., 2014).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Anzeige des Tierversuchsvorhabens**

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 Absatz 7 Satz 1 Nummer 2 des Tierschutzgesetzes bei der zuständigen Behörde angezeigt, bestätigt und wird unter folgendem Aktenzeichen bei der Regierung von Oberbayern geführt: 55.2-1 54-2532.2-23-12. An die Regierungen der weiteren beteiligten Bundesländer erging ebenfalls eine Tierschutzanzeige, die jeweils positiv beantwortet wurde.

#### **2. Ziel der Untersuchung**

Ziel der Untersuchung war es, in Betrieben mit unterschiedlichen Impfreimen gegen PCV2 einen aktuellen Überblick über die beim Schwein auftretenden PCV2-Genotypen zu gewinnen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich der PCV2-Status bezüglich der auftretenden Genotypen eines Einzeltieres im Laufe der unterschiedlichen Produktionsstufen der Schweineproduktion (Säugeperiode, Ferkelaufzucht und Mast) ändert. Als letztes sollte versucht werden, bei Einzeltieren isolierte PCV2-Stämme mittels Genomequenzierung in Zusammenhang zu bringen oder zu eruieren, ob innerhalb eines definierten Zeitfensters Mutationen des PCV2-Genoms auftreten.

#### **3. Studienbetriebe**

Für die Studie wurden Ferkel von neun Ferkelerzeugerbetrieben eingeschlossen. Acht der Betriebe mästeten ihre Schweine selbst bis zur Schlachtung, waren also Kombibetriebe. Ein Betrieb verkaufte die Tiere an einen Mäster in 1:1-Anbindung, war also ein Ferkelerzeugerbetrieb. Die Betriebe wurden nach ihrem PCV2-Impfreime in drei Gruppen aufgeteilt: Nichtimpfbetriebe (NI), Ferkelimpfbetriebe (FI) und Sauenimpfbetriebe (SI). Ein Überblick über die Betriebsstruktur, das PCV2-Impfreime und die geographische Lage der Betriebe ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Daten zu den Studienbetrieben\*

Betrieb	Bundesland	Betriebsstruktur	PCV2 Impfregime (Gruppe)	Größe (Anzahl Sauen)	Mastplätze
1	NRW	1:1 Anbindung	NI	300	1250
2	NRW	Kombi-Betrieb	NI	190	1640
3	NDS	Kombi-Betrieb	NI	215	1300
4	BY	Kombi-Betrieb	FI	200	1600
5	NRW	Kombi-Betrieb	FI	200	1500
6	ST	Kombi-Betrieb	FI	2500	9000
7	BY	Kombi-Betrieb	SI	105	600
8	NDS	Kombi-Betrieb	SI	230	1800
9	NRW	Kombi-Betrieb	SI	300	240

\* Jedem Betrieb wurde eine Nummer zugewiesen (1-9), die Standorte waren in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen (NRW), Niedersachsen (NDS), Bayern (BY) und Sachsen-Anhalt (ST). Nach den PCV2-Impfregimen sind die Betriebe in drei Gruppen aufgeteilt (NI=Nichtimpfbetriebe, FI=Ferkelimpfbetriebe, SI=Sauenimpfbetriebe).

#### 4. Impfstatus

Die in die vorliegende Studie eingeschlossenen Betriebe impften entweder Ferkel (FI) oder Sauen (SI) gegen PCV2, oder die Betriebe führten keine Impfung gegen PCV2 durch (NI). Andere Pathogene betreffende Impfungen, die in den Studienbetrieben eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: In den Studienbetrieben 1-9 durchgeführte Impfprogramme \*

Vakzinierung	NI			FI			SI		
Betrieb	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Porcines Parvovirus	S	-	S	S	S	S	S	S	S
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	S	-	S	S	S	-	S	S	S
Influenza A	S	-	-	S	S	-	S	S	S
PRRSV	-	-	S / F	S	S	-	S	S / F	S
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	S	S	S	S	S / F	S
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	S	-	S	-	S
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	F	F	
<i>Lawsonia intracellularis</i>	-	-	-	-	-	-	F	-	-
<i>Haemophilus parasuis</i>	-	-	-	-	-	-	F	-	-
Entwurmung / Enträudung	-	-	S	S	S	S	-	S	S

\*PCV2-Impfgruppen: Nichtimpfer=NI, Ferkelimpfer=FI und Sauenimpfer=SI, Sonstige Vakzinen nach Erregern: F=Ferkelimpfung, S=Sauenimpfung

## **5. Studientiere**

### **5.1. Sauen**

Pro Betrieb wurden insgesamt 15 Sauen einer Abferkelgruppe in die Studie eingeschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Sauengruppe möglichst aus jeweils 5 Jungsauen (erster Wurf), 5 Altsauen (2. bis 4. Wurf) und 5 alten Altsauen (mehr als 5 Würfe) zusammensetzte. Wenn mehr als 5 Sauen pro Altersgruppe zur Auswahl standen, wurden die Tiere von einer dritten Person (Landwirt oder Hilfskraft) zufällig ausgewählt. Standen pro Betrieb und Abferkelgruppe nur genau 5 oder weniger Tiere pro Kategorie zur Verfügung, dann wurden alle Tiere in die entsprechende Gruppe aufgenommen.

### **5.2. Ferkel**

Von jeder Sau wurden jeweils 6 Ferkel (inklusive 3 Ersatztiere) zufällig ausgesucht und in die Studie eingeschlossen, so ergab sich eine Gesamttierzahl von 810 Ferkeln wovon 405 Tiere zur labordiagnostischen Auswertung herangezogen werden sollten.

## **6. Probenentnahme**

Der Einschluss der Ferkel begann in der ersten Lebenswoche (Lebenstag 1-3) zusammen mit der ersten Blutprobenentnahme. Des Weiteren wurden bei jedem Ferkel in der dritten und vierten sowie in der 8., 12., 16., 20. und 24. Lebenswoche Blut entnommen.

### **6.1. Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte bei den Saugferkeln durch Punktion der *Vena cava cranialis*, bei älteren Tieren durch Punktion der *Vena jugularis externa*. Zur Blutentnahme wurden die Ferkel von einer Person in Rückenlage fixiert und somit die Punktion des entsprechenden Blutgefäßes ermöglicht. Bei Mastläufern und adulten Mastschweinen erfolgte die Blutentnahme im Stehen, dazu wurden die Tiere kurz mit einer Oberkieferschlinge von einer Hilfsperson fixiert.

Die Blutentnahmesysteme (Primavette® der Firma Kabe Labortechnik,

Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland, mit 10 ml Fassungsvermögen) wurden mittels eines wasserfesten Stifts beschriftet, so dass jede Probe jedem Tier einzeln zugeordnet werden konnte. Zur Venenpunktion wurden sterile Einmalkanülen verwendet. Bis zum Tag 56 wurden Kanülen der Größe 0,8x40 mm (Sterican®, Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) verwendet, danach bis Tag 140 kam die Kanülengröße 1,1x50 mm (Sterican®, Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz) zum Einsatz. Zum Mastende erfolgte die Blutentnahme mit Kanülen der Größe 1,2x75 mm (SUPRA®, Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen, Deutschland). Die Blutproben wurden zwischen 4°C und 8°C gekühlt transportiert und innerhalb von maximal 24 Stunden im Labor der Klinik für Schweine für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Hettich® Rotana 460R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Im Anschluss wurde das gewonnene Serum auf drei Kryoröhrchen der Firma Eppendorf (Safe-Lock Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verteilt, beschriftet und bei -20 Grad Celsius bis zur weiteren Bearbeitung tiefgefroren.

## **7. Labordiagnostische Untersuchungen**

Das von den Tieren gewonnene Serum wurde am Ende der Klinischen Phase mittels einer quantitativen PCV2-PCR (siehe Kapitel 7.1.) untersucht. PCV2-positive Proben wurden anschließend in einer Genotyp-differenzierenden Duplex-PCR (siehe Kapitel 7.2.) weiter analysiert. Bei einem Teil der Genotyp-bestimmten PCV2-Stämme wurde das Gesamtgenom amplifiziert und sequenziert (siehe Kapitel 7.3.), um eine phylogenetische Einordnung zu ermöglichen.

### **7.1. Quantitative PCV2-PCR**

Zur Bestimmung der Virusquantität in den Serumproben wurde die real-time PCR nach Zhao et al. (2010) verwendet, die eine Sequenz im ORF2 (Nukleokapsidgen) detektiert. Die Aufreinigung und Extraktion der DNA wurde mithilfe eines Roboters der Firma Hamilton (MICROLAB STAR LET®, Hamilton, 4970 Energy Way Reno, NV 89502 U.S.A) unter Verwendung des Extraktions-Kits (Nucleo Spin® Virus Core Kit-, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Für die real-time-PCR wurde das QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Je Reaktion wurden 12,5 µl PCR-Mastermix, 5,5 µl RNase freies Wasser, 2 µl Primer-Sonden-Mix und 5 µl DNA-Eluat angesetzt. Primersequenzen und -konzentrationen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprofil mittels Stratagene MX3005® bzw. MX3000® (Agilent Technologies, Santa Clara CA, United States) durchgeführt: Polymeraseaktivierung bei 94°C für 15 min, dann 42 Zyklen mit jeweils 15 sek bei 94°C zur Denaturierung und 60 sek bei 60°C für Annealing und Extension. Um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen, wurde ein Plasmid in bekannter Konzentration, das die zu amplifizierende PCV2-Sequenz enthält, in fünf log10-Verdünnungsstufen bei jedem PCR-Lauf mitgetestet.

Tabelle 4: Primer und Sonde für die PCV2-real-time PCR (Zhao et al., 2010)

Name	Konzentration	Sequenz
PCV2-for	600nM	5' - CGG ATA TTG TAK TCC TGG TCG TA - 3'
PCV2-rev	600nM	5' - CCT GTC CTA GAT TCC CCT ATT GAT T - 3'
Sonde PCV2	300nM	5' -FAM- CTA GGC CTA CGT GGT CTA CAT TTC – BHQ1

## 7.2. Genotyp-differenzierende PCV2-PCR

Alle in der real-time PCR positiv auf PCV2 getesteten Seren wurden zur Genotypisierung mittels einer Duplex-PCR (Opriessnig et al., 2010) weiter untersucht. Diese kann aufgrund zweier unterschiedlich gelabelter Sonden einen für den jeweiligen Genotyp konservierten, spezifischen Genbereich im ORF2 (Cheung et al., 2007) nachweisen. Die Sonde für den Genotyp 2a wurde insofern modifiziert, als dass deren Bindungsstelle auf den Komplementärstrang (verglichen mit der Originalpublikation) verlegt wurde. Primersequenzen und -konzentrationen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Primer und Sonde für die PCV2-Genotyp-PCR (Opriessnig et al., 2010) (modifiziert\*)

Name	Konzentration	Sequenz
PCV2-for	600nM	5' - GCA GGG CCA GAA TTC AAC C - 3'
PCV2-rev	600nM	5' - GGC GGT GGA CAT GAT GAG A - 3'
Sonde PCV2a*	200nM	5' -FAM- CAA AGG GTA TAG AGA TTT TGT TGG TCC C – BHQ1
Sonde PCV2b	200nM	5' -HEX- CTC AAA CCC CCG CTC TGT GCC C – BHQ1

Für die real-time PCR wurde wie zuvor beschrieben, das QuantiTect Probe PCR Kit eingesetzt. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: Polymeraseaktivierung bei 94°C für 15 min, dann 42 Zyklen mit jeweils 15 sek bei 94°C zur Denaturierung, 20 sek bei 60°C für das Annealing und 30 sek bei 72°C für die Extension.

### 7.3. Vollständigensequenzierung des PCV2

Bei ausgewählten PCV2-Isolaten wurde das Gesamtgenom sequenziert. Die Vorauswahl der Proben erfolgte nach der Virusmenge, da die Qualität der Sequenzierungsergebnisse bei stark positiven Proben deutlich zunimmt. Mittels einer von Gagnon et al. (2007) veröffentlichten PCR (Tabelle 6) und dem Ready Mix Taq Reaction Mix (Sigma-Aldrich) wurden DNA-Fragmente von 1245bp und 1045bp amplifiziert, die das gesamte, zirkuläre Genom des PCV2 abdecken und sich an den jeweiligen Enden über mehr als 200bp überlagern. Folgendes Temperaturprotokoll wurde durchgeführt: Polymeraseaktivierung bei 95°C für 3 min, dann 35 Zyklen mit jeweils 30 sek bei 95°C zur Denaturierung, 1 min bei 52°C für das Annealing und 2 min bei 72°C für die Extension. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Beim Nachweis entsprechender DNA-Fragmente im Gel wurde das PCR-Produkt mithilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega Corporation, 2800 Madison, USA) aufgereinigt und zur Auftragssequenzierung an Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) versandt. Erhaltene Teilsequenzen wurden im Anschluss mithilfe des Lasergene®-Softwarepakets MegAlign® und EditSeq® der Firma DNASTAR zu Vollsequenzen zusammengefügt (DNASTAR, Inc., Madison, USA). Zur Erstellung eines genetischen Stammbaums wurde die Software „Mega 6“ (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, The Biodesign Institute, Tempe, USA) verwendet.

Tabelle 6: Primer für die PCV2-Sequenzierungs-PCR nach (Gagnon et al., 2007)

Name	Konzentration	Sequenz
PCV2-A for	500nM	5' - GGA CCC CAA CCC CAT AAA A - 3'
PCV2-A rev	500nM	5' - CCC TCA CCT ATG ACC CCT ATG T - 3'
PCV2-B for	500nM	5' - TGT TTT CGA ACG CAG TGC C - 3'
PCV2-B rev	500nM	5' - CCG TTG TCC CTG AGA TCT AGG A - 3'

## **8. Proben-Codierung**

Anhand eines Beispiels wird im Folgenden die Codierung der Proben, die für den phylogenetischen Stammbaum verwendet wurden, erläutert.

### **PCV2b\_1.16.2.13**

**PCV2b=Genotyp; 1.=Betrieb; 16.=Muttersau; 2.=Ferkel; 13=Lebenswoche des Ferkels**

## **9. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS Version 21.0 und Microsoft Excel für Windows 7 an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München. Jedes Einzeltier wurde als eine statistische Einheit angesehen. Das Signifikanzniveau lag bei 5% mit einem Konfidenzintervall von 95%. Bei der Durchführung mehrerer aufeinander folgender Paarvergleiche wurde eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm angewendet (1,7%, 2,5%, und 5%).

Bei der Nullhypothese ging man davon aus, dass zwischen den Gruppen für die untersuchten Parameter kein Unterschied besteht.

Für die Gruppen „PCV2a-positiv“ und „PCV2b-positiv“ wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Minimal- und Maximalwerte für die Virusgenomkopien / ml Serum (gesamt und zu jedem Untersuchungszeitpunkt) berechnet. Um Unterschiede in der mittleren Höhe der Virämie zwischen PCV2a und PCV2b zu ermitteln wurden sowohl impfgruppenunabhängig, als auch in Abhängigkeit vom auf dem Betrieb vorherrschenden Impfschema Mittelwertvergleiche durchgeführt. Zunächst wurde ein Kolmogorow-Smirnow Test auf Normalverteilung mit einer Korrektur nach Lilliefors durchgeführt. Da die Mittelwerte der Virusgenomkopien / ml Serum sich als nicht normalverteilt darstellten, wurden diese mittels Kruskal-Wallis Test verglichen. Bei errechneter Signifikanz wurde im Anschluss ein nicht parametrischer Mann-Whitney-U-Test



durchgeführt. Des Weiteren wurde die Häufigkeitsverteilung von PCV2-positiven Tieren insgesamt und zu den verschiedenen Zeitpunkten zwischen den Impfgruppen verglichen. Hierfür wurden die Kategorien „PCV2-positiv“, „PCV2a-positiv“ und „PCV2b-positiv“ sowie auch „PCV2a und PCV2b positiv“ deskriptiv dargestellt und mittels Kreuztabellen und  $\chi^2$ -Test miteinander verglichen.

## **IV. ERGEBNISSE**

Es konnten die Daten von insgesamt 383 Tieren ausgewertet werden. Alle Blutproben wurden mithilfe der im Material und Methodenteil beschriebenen PCR-Methoden qualitativ und quantitativ auf PCV2 untersucht und anschließend genotypisiert. Einige Proben, die über dem Wert von  $10^4$  PCV2-Genomkopien pro ml Serum lagen, wurden mittels Genomsequenzierung weiter untersucht, dabei handelte es sich um folgende Probennummern: 1.16.2.16, 1.6.1.16, 7.8.3.20, 2.8.3.16, 2.14.2.12, 3.8.3.16, 3.15.3.16, 9.6.3.24, 9.11.2.20, 1.11.2.16, 1.1.2.16, 3.5.3.16, 3.12.4.16, 4.6.1.24, 8.11.1.16, 8.5.4.16.

### **1. Qualitative Auswertung der Serumproben mittels PCV2 real-time PCR**

#### **1.1. Häufigkeit PCV2 positiver Tiere**

Im folgenden Kapitel wird die Häufigkeit PCV2 positiver Tiere sowohl ohne als auch mit Berücksichtigung der Genotypen PCV2a und PCV2b angegeben, eine Übersicht dazu gibt Tabelle 7. Unabhängig vom Genotyp kam PCV2 signifikant häufiger bei Nichtimpfbetrieben vor als bei Impfbetrieben. Die Häufigkeit PCV2-positiver Tiere war in der Ferkelimpfgruppe mit 10 Tieren (7,8%) signifikant niedriger ( $p=0,000$ ) als in der Nichtimpfgruppe mit 124 Tieren (97,6%) und in der Sauenimpfgruppe mit 83 Tieren (65,4%) ( $p=0,000$ ). Außerdem war die Häufigkeit PCV2-positiver Tiere in der Sauenimpfgruppe signifikant niedriger als in der Nichtimpfgruppe ( $p=0,000$ ).

Beim Vergleich der Impfgruppen unter Berücksichtigung des Genotyps ergab sich, dass in der Ferkelimpfgruppe (0 Tiere) im Studienverlauf signifikant weniger Tiere PCV2a-virämisch wurden als in der Nichtimpfgruppe (7 Tiere, 5,5%) ( $p=0,007$ ) und auch signifikant weniger als in der Sauenimpfgruppe (8 Tiere, 6,3%) ( $p=0,003$ ). Die Häufigkeiten eines PCV2a-Nachweises unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen NI und SI.

Für Genotyp PCV2b waren über die Zeit der Studie hinweg signifikant weniger

( $p=0,000$ ) Tiere der Ferkelimpfgruppe positiv (10 Tiere, 7,8%) als der Nichtimpfgruppe (117 Tiere, 92,1%) und der Sauenimpfgruppe (75 Tiere, 59,1%). Außerdem waren Tiere der Sauenimpfgruppe signifikant weniger häufig PCV2b-positiv als Tiere der Nichtimpfgruppe ( $p=0,000$ ).

Tabelle 7: Mindestens 1x PCV2-positive Tiere für PCV2 Genotyp a, b oder a+b\*

Gruppe	Nur PCV2a n / % (Gruppe)	Nur PCV2b n / % (Gruppe)	PCV2 n / % (Gruppe)
Nichtimpfer (n = 127)	7 / 5,5	117 / 92,1	124 / 97,6
Ferkelimpfer (n = 129)	0 / 0	10 / 7,8	10 / 7,8
Sauenimpfer (n = 127)	8 / 6,3	75 / 59,1	83 / 65,4
Gesamt (n=383)	15 / 3,9	202 / 52,7	217 / 56,6

\*aufgeteilt nach PCV2a, PCV2b und PCV2a+b. In den Zeilen „Nichtimpfer“, „Ferkelimpfer“ und „Sauenimpfer“ sind die Tiere eingetragen, die für den Genotyp der jeweiligen Spalte während des Studienzeitraums mindestens einmal positiv waren (Anzahl der Positiven und prozentual von der jeweiligen Gruppe. Als mindestens einmal positiv für einen Genotypen gilt ein Tier, das für PCV2a oder PCV2b oder PCV2a+b mindestens einmal während des gesamten Untersuchungszeitraums positiv war)

## 1.2. Vorkommen von PCV2a und PCV2b im Studienverlauf

Ein Überblick über die Verteilung PCV2-positiver Tiere, geordnet nach Genotypen und Impfgruppen ist als Übersicht in Abbildung 1 dargestellt, die auf den Daten aus Tabelle 8 basiert. In einem Betrieb der Nichtimpfgruppe kamen 5 (1,3%) Tiere vor, die an einem oder mehreren Probenzeitpunkten für PCV2a und PCV2b gleichzeitig positiv waren (4 (1%) Tiere in der 16., 2 (0,5%) Tiere in der 20. und 1 (0,3%) Tier in der 24. Lebenswoche), diese wurden sowohl jeweils den PCV2a als auch PCV2b-positiven Proben zugeordnet.

### 1.2.1. Vorkommen von PCV2b

Der erste Nachweis von PCV2b gelang aus dem Serum von 17 (4,4%) Tieren in der 12. Lebenswoche. Dabei waren 13 (3,4%) Tiere aus zwei Nichtimpfbetrieben und 4 (1%) Tiere aus einem Sauenimpfbetrieb PCV2b-positiv. Kein Tier aus der Gruppe der Ferkelimpfer war zu diesem Zeitpunkt PCV2b-positiv. In der 12.

Lebenswoche war nur die Anzahl PCV2b-virämischer Tiere in der Gruppe NI signifikant höher als in der Gruppe FI ( $p=0,000$ ). In der 16. Lebenswoche wurden PCV2b-positive Serumproben aus allen Nichtimpfbetrieben, zwei Sauenimpfbetrieben und einem Ferkelimpfbetrieb nachgewiesen. Dabei war der Anteil PCV2b-positiver Tiere mit insgesamt 88 (69,3%) Tieren in der Gruppe der Nichtimpfbetriebe am höchsten, signifikant geringer der Anteil in der Gruppe der Sauenimpfbetriebe (32 Tiere, 25,2%) ( $p=0,000$ ). In den Ferkelimpfbetrieben waren 5 Tiere (3,9%) PCV2b-positiv und damit signifikant weniger als in den Gruppen SI ( $p=0,000$ ) und NI ( $p=0,000$ ). Zu diesem Zeitpunkt war in allen Nichtimpfbetrieben 97 (76,4%) Tiere, in allen Sauenimpfbetrieben 54 (42,5%) Tiere und in einem Ferkelimpfbetrieb 4 (3,1%) Tiere PCV2b nachweisbar. In Gruppe FI waren signifikant weniger Tiere PCV2b-positiv als in Gruppe SI und NI, außerdem signifikant weniger Tiere in Gruppe SI im Vergleich zu Gruppe NI. Alle Unterschiede für LW20 waren signifikant ( $p=0,000$ ). In Nichtimpfbetrieben waren insgesamt 77 Tiere (60,6%) PCV2b-positiv, jedoch signifikant weniger als in den drei Sauenimpfbetrieben (61 Tiere, 48,0%) ( $p=0,000$ ) und den zwei Ferkelimpfbetrieben (4 Tiere, 3,1%) ( $p=0,000$ ).

### **1.2.2. Vorkommen von PCV2a**

Der erstmalige Nachweis von PCV2a gelang in der 16. Lebenswoche der Ferkel. Zu diesem Zeitpunkt waren in der Gruppe der Nichtimpfbetriebe 6 (4,7%) Tiere PCV2a-positiv und kein Tier in den Gruppen FI und SI. Die Gruppen NI und FI unterschieden sich für die 16. Lebenswoche signifikant ( $p=0,014$ ). In der 20. Lebenswoche waren drei Tiere (2,4%) der NI-Gruppe und ein Tier (0,8%) der SI-Gruppe PCV2a-positiv. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. In Lebenswoche 24 wurde PCV2a bei einem Tier (0,8%) aus der Gruppe NI und bei acht Tieren (6,3%) aus Gruppe SI nachgewiesen, zu diesem Zeitpunkt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

### **1.2.3. PCV2a und PCV2b simultan im selben Tier:**

Das gleichzeitige Auftreten von PCV2a und PCV2b in einem Tier konnte erstmals in der 16. Lebenswoche und auf einem Betrieb (Betrieb 1) der Nichtimpfgruppe festgestellt werden, dabei waren 4 (1%) Tiere betroffen. Die Zahl sank in der 20.

Lebenswoche auf zwei (0,5%) Tiere ab, in der 24. Lebenswoche, war noch ein (0,3%) Tier betroffen.

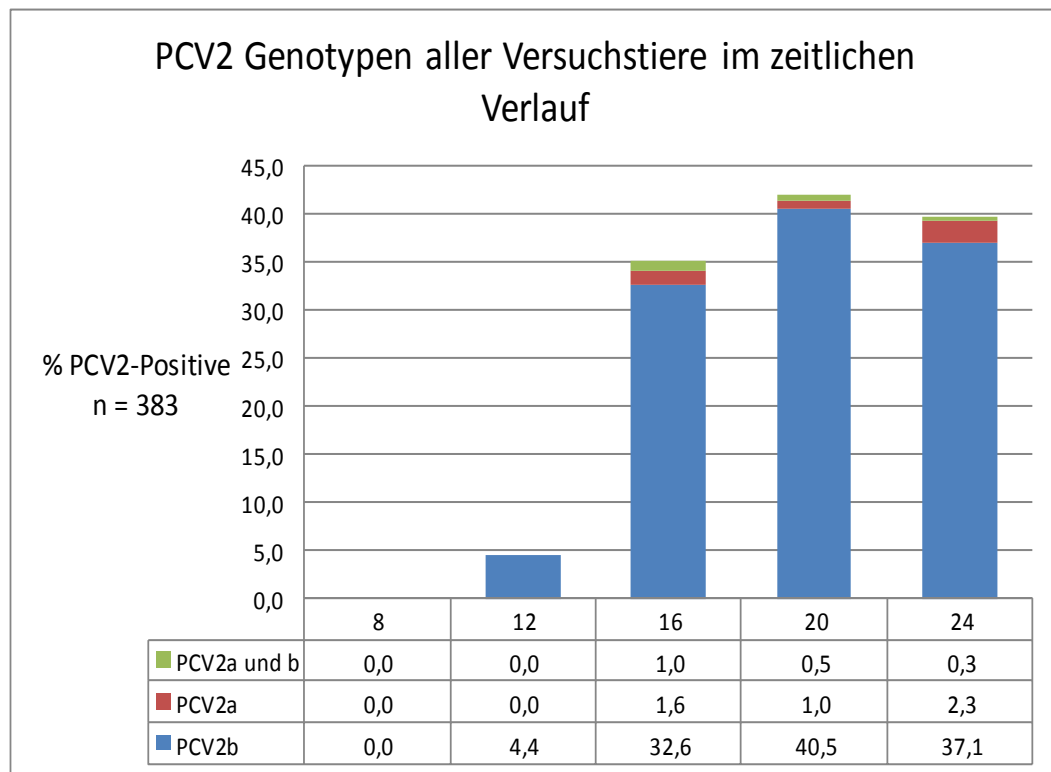


Abbildung 1: Anteil PCV2-positiver Tiere aufgeteilt nach Genotypen

Angabe der PCV2-positiven Tiere nach Genotyp (grün=PCV2a und b, rot=PCV2a, blau=PCV2b) unter Berücksichtigung aller Zeitpunkte an denen PCV2 nachgewiesen wurde (Lebenswochen 12, 16, 20 und 24)

Tabelle 8: Anzahl PCV2-positiver Tiere nach Impfgruppen\*

			LW1	LW3	LW4	LW8	LW12	LW16	LW20	LW24
NI n=127	n	PCV2a	0	0	0	0	0	6	3	1
	%		0	0	0	0	0	4,7	2,4	0,8
	n	PCV2b	0	0	0	0	13	88	97	77
	%		0	0	0	0	10,2	69,3	76,4	60,6
	n	davon	0	0	0	0	0	4	2	1
	%	PCV2a+b	0	0	0	0	0	1	0,5	0,3
FI n=129	n	PCV2a	0	0	0	0	0	0	0	0
	%		0	0	0	0	0	0	0	0
	n	PCV2b	0	0	0	0	0	5	4	4
	%		0	0	0	0	0	3,9	3,1	3,1
	n	davon	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	PCV2a+b	0	0	0	0	0	0	0	0
SI n=127	n	PCV2a	0	0	0	0	0	0	1	8
	%		0	0	0	0	0	0	0,8	6,3
	n	PCV2b	0	0	0	0	4	32	54	61
	%		0	0	0	0	3,1	25,2	42,5	48,0
	n	davon	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	PCV2a+b	0	0	0	0	0	0	0	0
NI+FI+SI n = 383	n	PCV2a	0	0	0	0	0	6	4	9
	%		0	0	0	0	0	1,6	1	2,3
	n	PCV2b	0	0	0	0	17	125	155	142
	%		0	0	0	0	4,4	32,6	40,5	37,1
	n	davon	0	0	0	0	0	4	2	1
	%	PCV2a+b	0	0	0	0	0	1	0,5	0,3
PCV2	n	Ges. pos.	0	0	0	0	17	135	161	152
	%		0	0	0	0	4,4	35,2	42	39,7

\*In den oberen drei Zeilen (NI, FI, SI) ist die Anzahl (und der prozentuale Anteil an der Impfgruppe) der PCV2 Genotyp positiven Tiere nach Impfgruppen dargestellt. In Zeile vier ist die Anzahl der PCV2-positiven Tiere unter Berücksichtigung der Genotypen und der Prozentsatz von der Gesamt tierzahl (n = 383) nach Lebenswochen angegeben. In der fünften Zeile ist die Anzahl der PCV2-positiven Tiere und deren Prozentsatz von der Gesamt tierzahl ohne Berücksichtigung der Genotypen aufgeführt. Für die Berechnung der PCV2a und PCV2b-positiven Tiere wurde jeweils die Anzahl der PCV2a+b-positiven Tiere mitberücksichtigt.

## **2. Quantitative Auswertung der Genotypen im Studienverlauf**

### **2.1. PCV2 Virämie nach Genotypen**

Unabhängig vom Impfstatus wurde über den gesamten Studienverlauf eine mittlere Virämie von  $8,49 \times 10^4$  Genomkopien pro ml Blutserum für PCV2a und  $4,53 \times 10^6$  für PCV2b festgestellt. Die durchschnittliche Virämie für PCV2b war signifikant höher ( $p=0,002$ ).

Verteilt nach den drei Impfgruppen ergab sich im Studienverlauf für PCV2a in Gruppe NI eine mittlere Virämie von  $2,5 \times 10^5$  und für SI von  $2,31 \times 10^4$  Genomkopien pro ml Serum, dieser Unterschied war nicht signifikant.

Für PCV2b wurden im Verlauf der Studie folgende mittlere Virämien (PCV2b-Genomkopien pro ml Blutserum) ermittelt. Ein Mittelwert von  $6,08 \times 10^6$  für NI,  $9,07 \times 10^4$  für FI und  $2,77 \times 10^6$  für SI. Der statistische Vergleich der drei Gruppen ergab nur zwischen FI und SI einen signifikanten Unterschied ( $p=0,002$ ).

Unabhängig vom Impfstatus, also für alle drei Gruppen (FI+SI+NI), wurden für die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte die Mittelwerte von PCV2a und PCV2b (Mittlere Höhe der Virämie) statistisch miteinander verglichen. Beim Vergleich dieser Werte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Des Weiteren wurden zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, jeweils innerhalb der drei Impfgruppen (NI, FI und SI), die mittlere Höhe der Virämie von PCV2a und PCV2b miteinander verglichen. Dabei ergab sich der einzige signifikante Unterschied in der Gruppe der Nichtimpfer (NI) in der 24. Lebenswoche. Dabei stellte sich die PCV2b-Virämie als signifikant höher als die PCV2a-Virämie heraus ( $p = 0,024$ ).

Zuletzt wurden noch für alle PCV2-positiven Probenzeitpunkte die Mittelwerte der Virämien innerhalb der Genotypen unter den verschiedenen Impfgruppen verglichen, um zu zeigen ob das PCV2-Impfregime die Virämie beeinflusst. Aufgrund der geringen Fallzahlen für PCV2a konnte die Auswertung nur für PCV2b durchgeführt werden.

In der 12. Lebenswoche wurde die mittlere PCV2-Virämie zwischen NI und SI verglichen, es gab keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,071$ ).

In der 16. Lebenswoche war die PCV2b-Virämie in der Gruppe NI signifikant höher als in Gruppe FI ( $p = 0,040$ ) und ebenso signifikant höher als in Gruppe SI ( $p = 0,028$ ). Zwischen Gruppe FI und SI bestand kein signifikanter Unterschied.

In der 20. Lebenswoche ergab sich lediglich beim Vergleich der PCV2b-Virämie von NI und SI ein Unterschied, die Virämie war bei Gruppe SI signifikant höher als bei Gruppe NI ( $p = 0,001$ ).

Bei Betrachtung des Probenzeitpunkts der 24. Lebenswoche war wiederum ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe NI und SI, jedoch war im Gegensatz zur 20. Lebenswoche die Virämie bei NI signifikant höher als bei SI ( $p = 0,004$ ).

In Tabelle 9 sind die Mittelwerte, die Minimal- und Maximalwerte und die Standardabweichungen der festgestellten Virus-DNA-Mengen, aufgeteilt nach Impfgruppen, dargestellt. Die Höhe wird als Anzahl der Genomkopien pro Milliliter Serum angegeben.

Tabelle 9: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere\*

Gruppe, n	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
NI (n=127)	PCV2a	n	0	2	1	0
		MW	0	8,50E+05	4,20E+03	0
		StabW	0	1,09E+06	-	0
		Min.	0	7,96E+04	-	0
		Max.	0	1,62E+06	-	0
	PCV2b	n	13	84	95	76
		MW	1,91E+07	2,21E+07	1,98E+05	8,75E+05
		StabW	5,24E+07	8,64E+07	4,68E+05	6,26E+06
		Min.	3,00E+03	1,60E+03	1,40E+03	8,00E+02
		Max.	1,89E+08	6,02E+08	2,37E+06	5,46E+07
	PCV2a+b	n	0	4	2	1
		MW	0	5,03E+05	1,16E+05	1,57E+05
		StabW	0	5,27E+05	1,44E+05	-
		Min.	0	2,01E+04	1,48E+04	-
		Max.	0	1,04E+06	2,18E+05	-
	PCV2a	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0



FI (n=129)	PCV2b	Max.	0	0	0	0
		n	0	5	4	4
		MW	0	5,57E+04	1,90E+04	1,75E+05
		StabW	0	7,55E+04	1,27E+04	3,32E+05
		Min.	0	8,20E+03	6,40E+03	1,40E+03
		Max.	0	1,90E+05	3,67E+04	6,72E+05
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
SI (n=127)	PCV2a	N	0	0	1	8
		MW	0	0	1,33E+05	1,57E+04
		StabW	0	0	-	2,27E+04
		Min.	0	0	-	1,00E+03
		Max.	0	0	-	6,99E+04
	PCV2b	n	4	32	54	61
		MW	1,81E+06	1,44E+07	1,48E+06	1,76E+05
		StabW	2,36E+06	3,39E+07	3,57E+06	5,98E+05
		Min.	3,78E+04	4,60E+03	2,40E+03	2,00E+03
		Max.	5,23E+06	1,75E+08	2,08E+07	4,50E+06
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
NI+FI+SI	PCV2a	n	0	2	2	8
		MW	0	8,50E+05	6,86E+04	1,57E+04
		StabW	0	1,09E+06	9,10E+04	2,27E+04
		Min.	0	7,96E+04	4,20E+03	1,00E+03
		Max.	0	1,62E+06	1,33E+05	6,99E+04
	PCV2b	n	17	121	153	141
		MW	1,51E+07	1,92E+07	6,47E+05	5,53E+05
		StabW	4,60E+07	7,41E+07	2,23E+06	4,62E+06
		Min.	3,00E+03	1,60E+03	1,40E+03	8,00E+02
		Max.	1,89E+08	6,02E+08	2,08E+07	5,46E+07
	PCV2a+b	n	0	4	2	1
		MW	0	5,03E+05	1,16E+05	1,57E+05
		StabW	0	5,27E+05	1,44E+05	-
		Min.	0	2,01E+04	1,48E+04	-
		Max.	0	1,04E+06	2,18E+05	-

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp und die Impfgruppe (n ist bei den Genotypen auf die Tierzahl der jeweiligen Impfgruppe bezogen) angegeben. Für die Berechnung der Mittelwerte nach Genotyp wurden nur die PCV2a- bzw. PCV2b-positiven Tiere, nicht die simultan infizierten Tiere berücksichtigt.

## **2.2. Virämie-Verlauf: Betriebe, die nicht gegen PCV2 vakzinierten**

Die Gruppe NI umfasste 3 Betriebe, die im Folgenden einzeln graphisch in den Abbildungen 2, 3 und 4 dargestellt sind. Unterhalb der Abbildungen findet sich zu jedem Betrieb eine Datentabelle, der die Mittelwerte für die Virämie, Standardabweichung, Anzahl der PCV2-positiven Tiere nach Genotyp sowie Minimal- und Maximalwerte zu entnehmen sind.

### **2.2.1. Betrieb 1**

In Betrieb 1 wurden 45 Tiere ausgewertet. Es kamen sowohl die Genotypen PCV2a und PCV2b als auch Mischinfektionen mit PCV2a und PCV2b vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 2 dargestellt.

#### **2.2.1.1. PCV2a:**

Erstmals wurde in der 16. Lebenswoche bei 6 Tieren (13,3%) PCV2a festgestellt, davon waren 4 Tiere (8,9%) PCV2a+b infiziert. In der 20. Lebenswoche waren 3 Tiere (6,7%) PCV2a-positiv. Ein Tier (2,2%), dasselbe wie in Woche 16 war erneut PCV2a+b infiziert, ein weiteres (2,2%) ebenfalls PCV2a+b, ein drittes Ferkel (2,2%) mit vorheriger PCV2a+b-Infektion PCV2a. In der 24. Lebenswoche war noch ein Tier (2,2%) aus der 20. Lebenswoche weiterhin PCV2a+b positiv.

#### **2.2.1.2. PCV2b:**

Für PCV2b waren erstmals in der 16. Lebenswoche 22 Tiere (48,9%) positiv, bzw. 26 Tiere (57,8%), wenn man PCV2a+b mitberücksichtigt. In der 20. Lebenswoche 28 Tiere (62,2%) bzw. 30 (66,7%) unter Berücksichtigung der PCV2a+b-Infektionen. In der 24. Lebenswoche waren 24 Tiere PCV2b positiv, ein Tier positiv für PCV2a und PCV2b (insgesamt 55,6%). 15 Tiere (33,3%) waren über 3 Zeitpunkte hintereinander positiv, 10 Tiere (22,2%) über zwei Zeitpunkte, wobei eines davon (2,2%) davor (LW16) für beide Genotypen positiv getestet wurde.

### 2.2.1.3. PCV2a und PCV2b simultan im selben Tier:

PCV2a+b gleichzeitig wurde erstmals in der 16. Lebenswoche bei 4 Tieren (8,9%) nachgewiesen. 2 Tiere (4,4%) waren in der 20. Lebenswoche für beide Genotypen positiv, eins davon zum zweiten Mal. In der 24. Lebenswoche war 1 Tier (2,2%) PCV2a+b positiv, es war zum zweiten Mal virämisch für beide Genotypen.

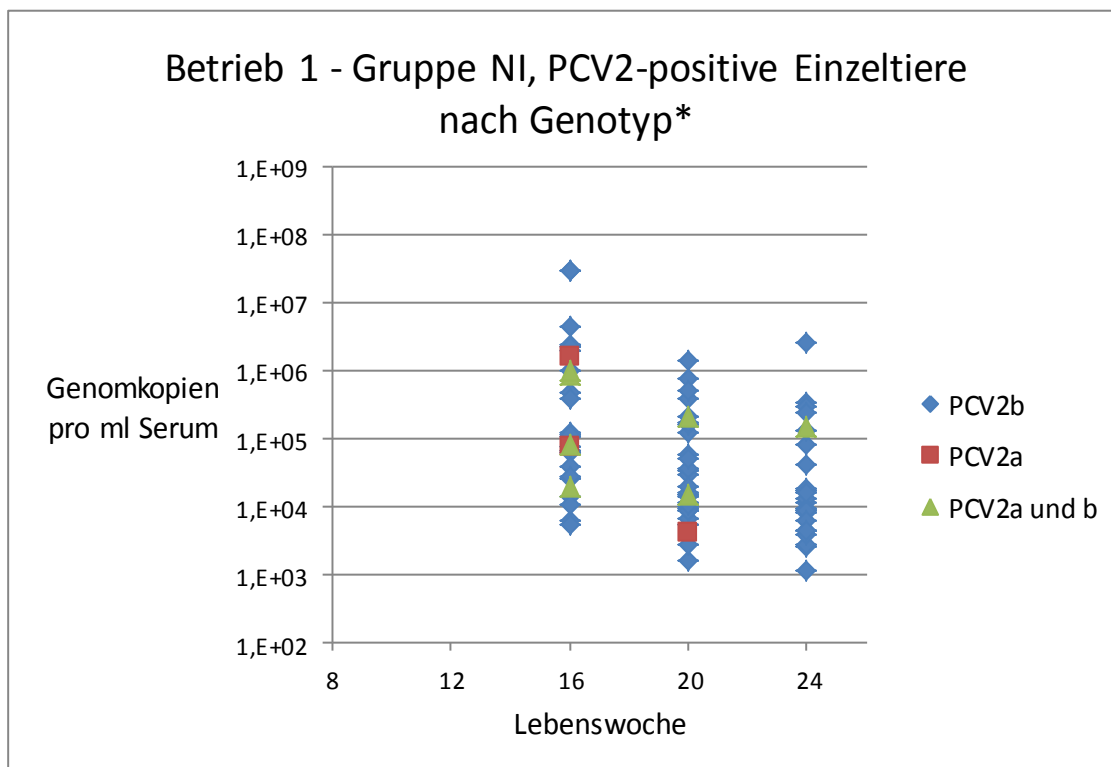


Abbildung 2: Virämie nach Genotypen, Betrieb 1

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 1 der Gruppe NI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 10: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 1, Gruppe NI\*

n = 45	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
NI Betrieb 1	PCV2a	n	0	2	1	0
		MW	0	8,50E+05	4,20E+03	0
		StabW	0	1,09E+06	-	0
		Min.	0	7,96E+04	-	0
		Max.	0	1,62E+06	-	0
	PCV2b	n	0	22	28	24
		MW	0	3,33E+06	1,47E+05	1,64E+05
		StabW	0	8,64E+06	3,02E+05	5,39E+05
		Min.	0	5,60E+03	1,60E+03	1,20E+03
		Max.	0	2,99E+07	1,39E+06	2,65E+06
	PCV2a+b	n	0	4	2	1
		MW	0	5,03E+05	1,16E+05	1,57E+05
		StabW	0	5,27E+05	1,44E+05	-
		Min.	0	2,01E+04	1,48E+04	-
		Max.	0	1,04E+06	2,18E+05	-

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp und die Impfgruppe (n bei den Genotypen auf die Tierzahl der jeweiligen Impfgruppe bezogen) angegeben. Für die Berechnung der Mittelwerte nach Genotyp wurden nur die PCV2a- bzw. PCV2b-positiven Tiere, nicht die simultan infizierten Tiere berücksichtigt.

### 2.2.2. Betrieb 2

In Betrieb 2 der Gruppe der Nichtimpfer wurden 38 Tiere ausgewertet. Es kam ausschließlich PCV2b vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 3 dargestellt.

#### 2.2.2.1. PCV2b:

Erstmals waren in der 12. Lebenswoche 7 Tiere (18,4%) positiv für PCV2b und in der 16. Lebenswoche 24 Tiere (63,2%). In der 20. Lebenswoche waren 30 Tiere (78,9%) PCV2b-positiv und in der 24. Lebenswoche 21 Tiere (55,3%).

Ein Tier (2,6%) war über 4 Zeitpunkte (LW12, 16, 20 und 24) PCV2b-positiv, 11 Tiere (28,9%) über 3 Zeitpunkte und 14 Tiere (36,8%) über 2 Zeitpunkte.

Bei zwei Tieren (5,3%) konnte beim mittleren von drei Zeitpunkten keine Virämie festgestellt werden, während sie am ersten und letzten Termin PCV2b-positiv waren.

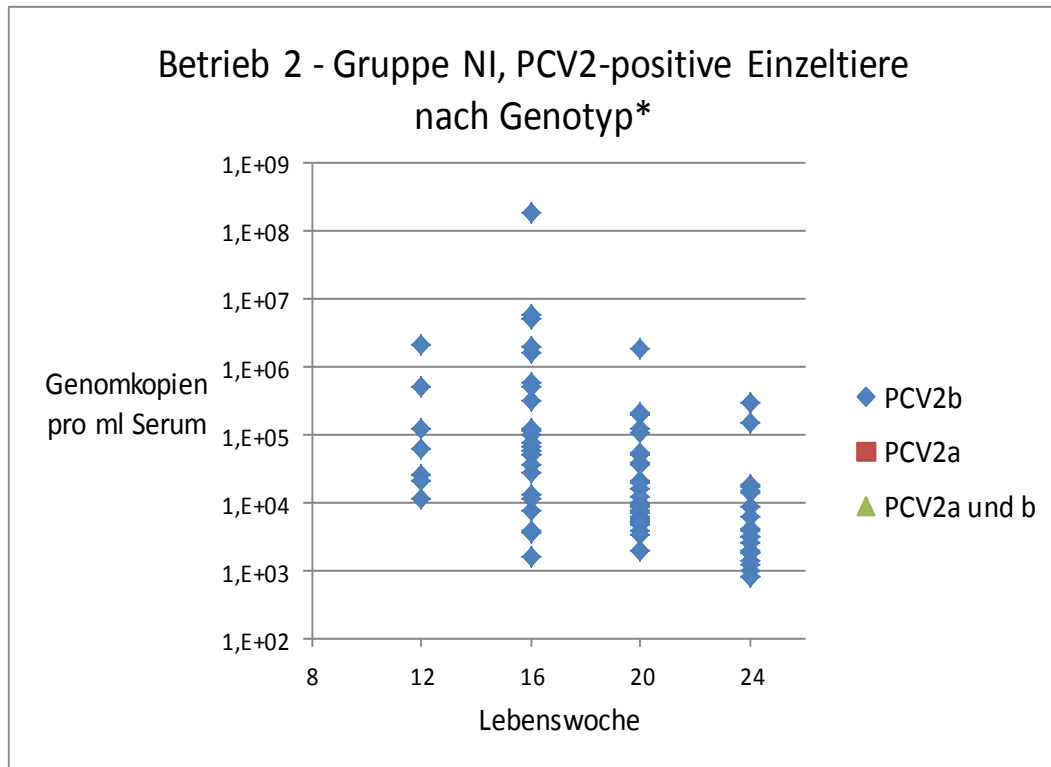


Abbildung 3: Virämie nach Genotypen, Betrieb 2

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 2 der Gruppe NI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 11: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 2, Gruppe NI\*

n = 38	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
NI Betrieb 2	PCV2a	N	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
	PCV2b	n	7	24	30	21
		MW	4,25E+05	8,79E+06	9,63E+04	2,68E+04
		StabW	8,02E+05	3,95E+07	3,42E+05	7,12E+04
		Min.	1,14E+04	1,60E+03	2,00E+03	8,00E+02
		Max.	2,20E+06	1,94E+08	1,89E+06	3,05E+05
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp auf der Ebene des Einzelbetriebes aus Gruppe NI (n auf die Tierzahl des Betriebes bezogen) angegeben.

### 2.2.3. Betrieb 3

In Betrieb 3 der Gruppe NI wurden 44 Tiere ausgewertet. Es kam ausschließlich PCV2b vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 4 dargestellt.

#### 2.2.3.1. PCV2b:

Erstmals waren in Betrieb 3 der Gruppe NI in der 12. Lebenswoche 6 Tiere (13,6%) PCV2b-positiv, in der 16. Lebenswoche stieg die Zahl auf 38 Tiere (86,4%) an. In der 20. Lebenswoche waren 37 Tiere PCV2b-positiv (84,1%), zum letzten Probenzeitpunkt in der 24. Lebenswoche 31 Tiere (70,5%).

Drei Tiere (6,8%) waren an vier Probenzeitpunkten hintereinander PCV2b-positiv, 20 Tiere (45,5%) an 3 Zeitpunkten und 12 Tiere (27,3%) an 2 Zeitpunkten.

Ein Tier war an zwei Probenzeitpunkten PCV2b-positiv, dann einmal negativ,

schließlich wieder PCV2b-positiv. Zwei Tiere waren am mittleren von drei Zeitpunkten negativ, am ersten und letzten Termin jedoch PCV2b-positiv.

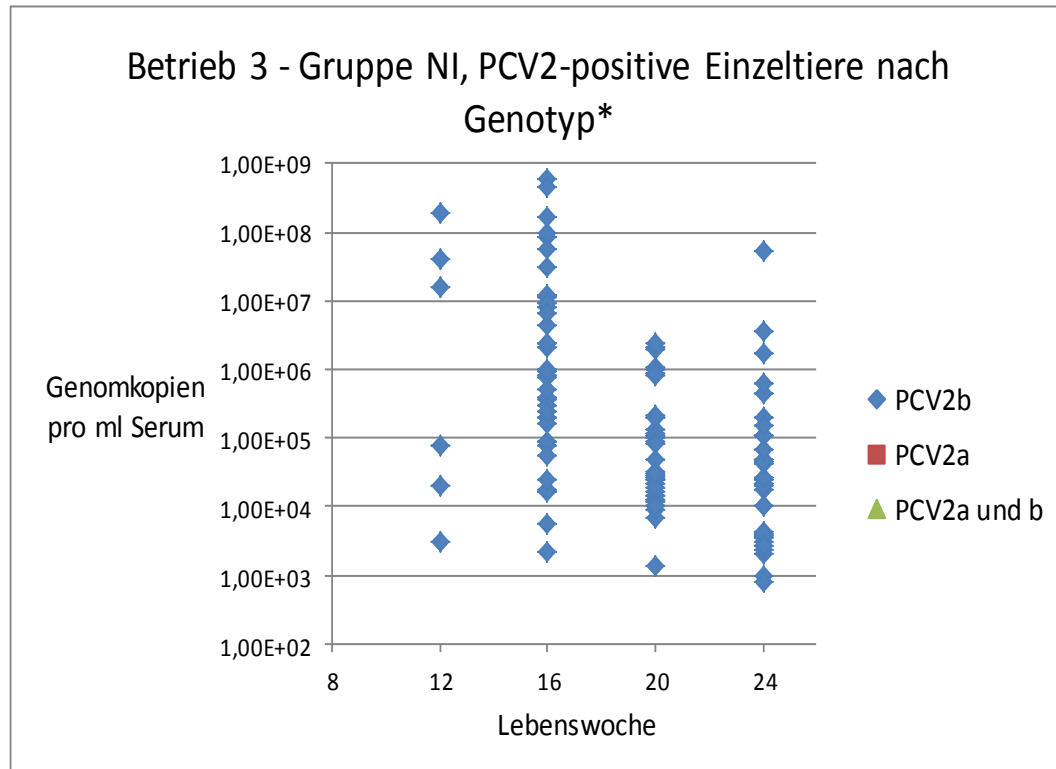


Abbildung 4: Virämie nach Genotypen, Betrieb 3

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 3 der Gruppe NI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 12: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 3, Gruppe NI\*

n = 44	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
NI Betrieb 3	PCV2a	N	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
	PCV2b	n	6	38	37	31
		MW	4,10E+07	4,14E+07	3,20E+05	2,00E+06
		StabW	7,44E+07	1,23E+08	6,19E+05	9,78E+06
		Min.	3,00E+03	2,20E+03	1,40E+03	8,00E+02
		Max.	1,89E+08	6,02E+08	2,37E+06	5,46E+07
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp auf der Ebene des Einzelbetriebes aus Gruppe NI (n auf die Tierzahl des Betriebes bezogen) angegeben.

### 2.3. Virämie-Verlauf: Betriebe, die Ferkel gegen PCV2 vakzinierten

Die zwei betroffenen Betriebe der Gruppe FI (Betriebe 4 und 5) sind einzeln graphisch in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. In einem Betrieb dieser Gruppe (Betrieb 6) konnte zu keinem Zeitpunkt PCV2 nachgewiesen werden, daher wird auf dessen graphische Darstellung verzichtet. Unterhalb der Abbildungen findet sich zu jedem Betrieb eine Datentabelle, der die Mittelwerte für die Virämie, Standardabweichung, Anzahl der PCV2-positiven Tiere nach Genotyp sowie Minimal- und Maximalwerte zu entnehmen sind.

#### 2.3.1. Betrieb 4

In Betrieb 4 wurden 45 Tiere ausgewertet, es kam nur PCV2b vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 5 dargestellt.



**2.3.1.1. PCV2b:**

Erstmals waren in Betrieb 4 der Ferkelimpfgruppe in der 16. Lebenswoche 5 Tiere (11,1% der 45 Tiere des Betriebes) PCV2b-positiv. In der 20. Lebenswoche sank die Anzahl auf 4 Tiere (8,9%) und in der 24. Lebenswoche auf 3 Tiere (6,7%) ab.

Ein Tier (2,2%) war an drei Zeitpunkten, ein anderes (2,2%) an 2 Zeitpunkten hintereinander positiv.

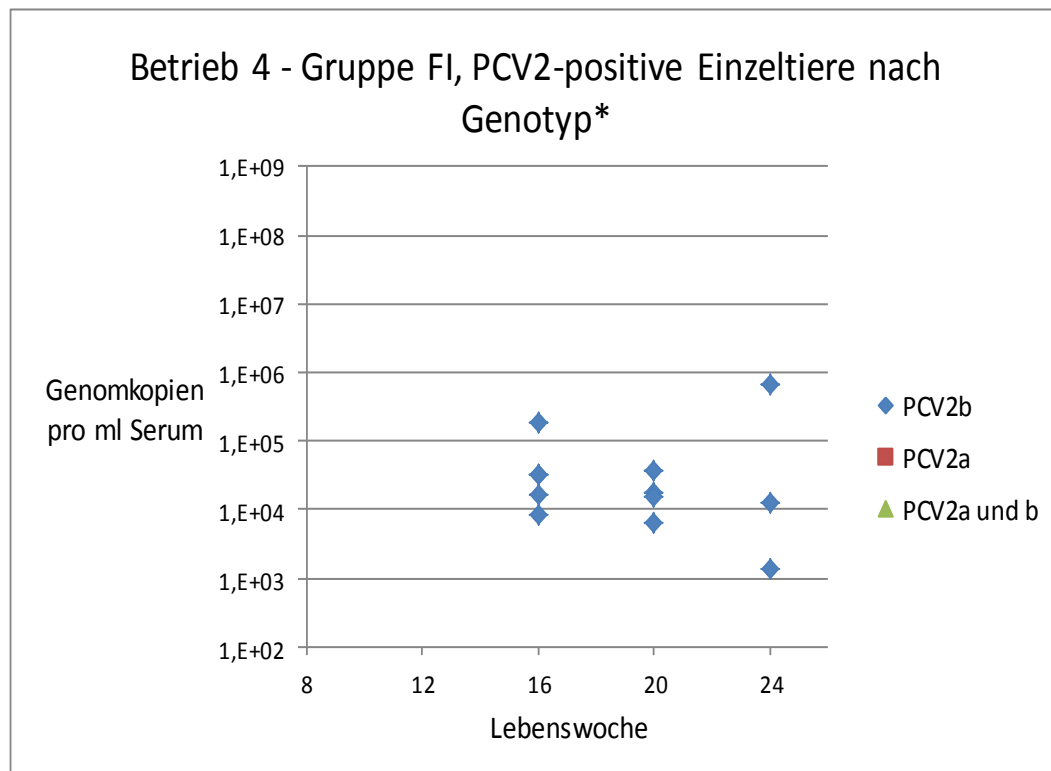


Abbildung 5: Virämie nach Genotypen, Betrieb 4

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 4 der Gruppe FI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 13: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 4, Gruppe FI\*

n = 45	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
FI Betrieb 4	PCV2a	N	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
	PCV2b	n	0	5	4	3
		MW	0	5,57E+04	1,90E+04	2,29E+05
		StabW	0	7,55E+04	1,27E+04	3,84E+05
		Min.	0	8,20E+03	6,40E+03	1,40E+03
		Max.	0	1,90E+05	3,67E+04	6,72E+05
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0

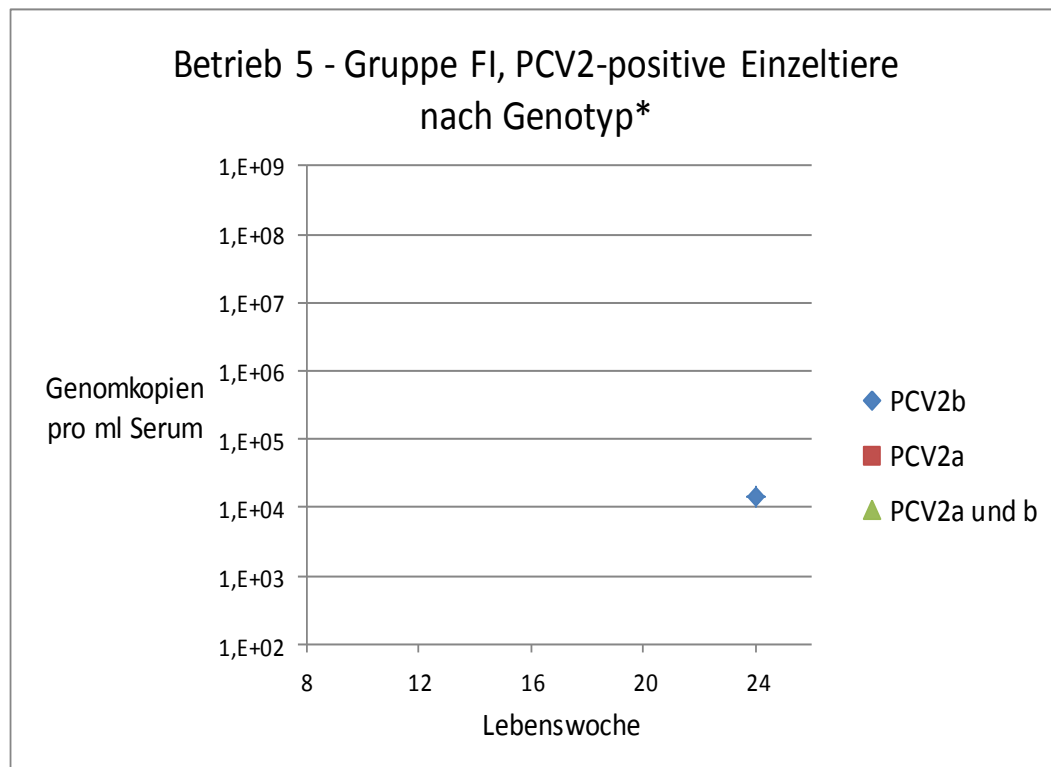
\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp auf der Ebene des Einzelbetriebes aus Gruppe FI (n auf Tierzahl des Betriebes bezogen) angegeben.

### 2.3.2. Betrieb 5

Von Betrieb 5 der Ferkelimpfgruppe wurden 45 Tiere ausgewertet, es kam ausschließlich PCV2b vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 6 dargestellt.

#### 2.3.2.1. PCV2b:

Es wurde in Betrieb 5 der Gruppe FI ausschließlich in der 24. Lebenswoche ein positives Tier (2,2%) gefunden.



**Abbildung 6: Virämie nach Genotypen, Betrieb 5**

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 5 der Gruppe FI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 14: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 5, Gruppe FI\*

n = 45	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
FI Betrieb 5	PCV2a	N	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
	PCV2b	n	0	0	0	1
		MW	0	0	0	1,40E+04
		StabW	0	0	0	-
		Min.	0	0	0	-
		Max.	0	0	0	-
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp auf der Ebene des Einzelbetriebes aus Gruppe FI (n auf die Tierzahl des Betriebes bezogen) angegeben.

### 2.3.3. Betrieb 6

In Betrieb 6 der Gruppe FI wurden 39 Tiere ausgewertet, es wurde zu keinem Zeitpunkt PCV2 nachgewiesen.

## 2.4. Virämie-Verlauf: Betriebe, die nur Sauen gegen PCV2 vakzinierten

Die drei Betriebe der Gruppe SI sind einzeln graphisch in den Abbildungen 7, 8 und 9 dargestellt. Unterhalb der Abbildungen findet sich zu jedem Betrieb eine Datentabelle, der die Mittelwerte für die Virämie, Standardabweichung, Anzahl der PCV2-positiven Tiere nach Genotyp sowie Minimal- und Maximalwerte zu entnehmen sind.

### 2.4.1. Betrieb 7

Von Betrieb 7 der Gruppe FI wurden 41 Tiere ausgewertet. Es kam ausschließlich der Genotyp PCV2a vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 7 dargestellt.

**2.4.1.1. PCV2a:**

In Betrieb 7 der Gruppe FI wurde in der 20. Lebenswoche ein positives Tier (2,4% von den 41 Tieren des Betriebes) gefunden, in der 24. Lebenswoche 8 Tiere (19,5%).

Ein Tier (2,4%) war an zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten positiv.

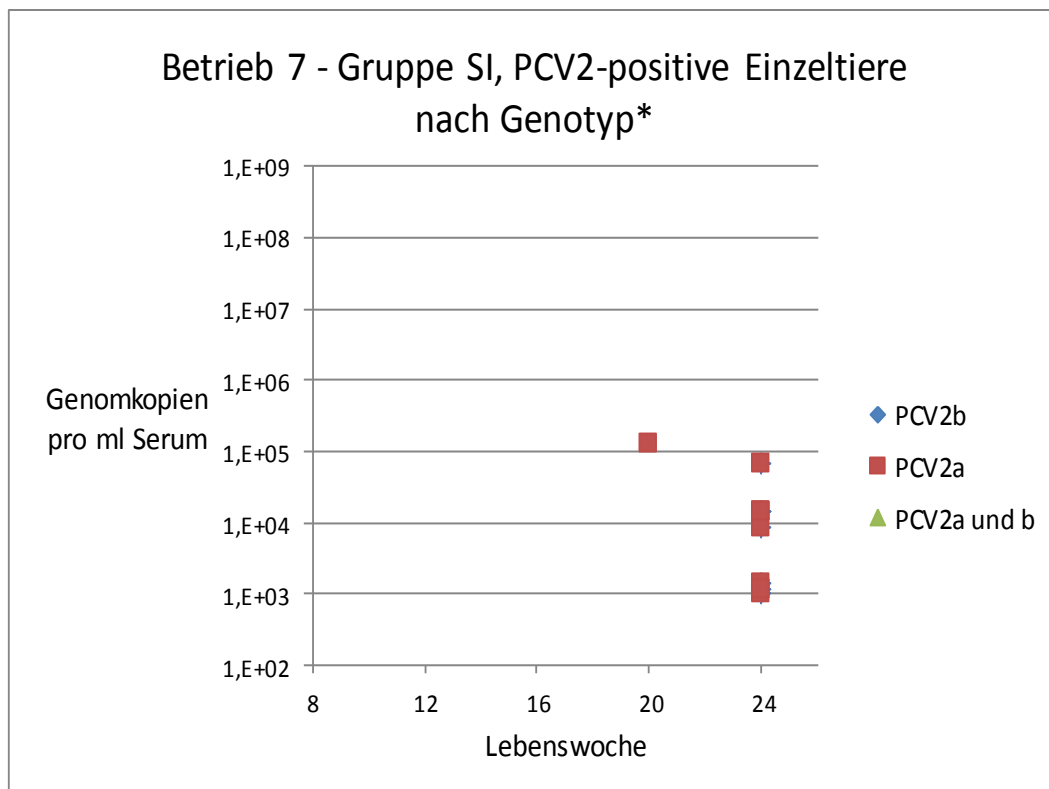


Abbildung 7: Virämie nach Genotypen, Betrieb 7

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 7 der Gruppe SI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 15: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 7, Gruppe SI\*

n = 41	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
SI Betrieb 7	PCV2a	N	0	0	1	8
		MW	0	0	1,33E+05	1,57E+04
		StabW	0	0	-	2,27E+04
		Min.	0	0	-	1,00E+03
		Max.	0	0	-	6,99E+04
	PCV2b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp auf der Ebene des Einzelbetriebes aus Gruppe SI (n auf die Tierzahl des Betriebes bezogen) angegeben.

#### 2.4.2. Betrieb 8

Es wurden von Betrieb 8 der Gruppe SI 44 Tiere ausgewertet. Es kam ausschließlich PCV2b vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 8 dargestellt.

##### 2.4.2.1. PCV2b:

In Betrieb 8 der Gruppe SI wurden in der 12. Lebenswoche die ersten 4 Tiere (9,1%) positiv getestet. In der 16. Lebenswoche waren 30 Tiere (68,2%) positiv, in der 20. Lebenswoche 33 Tiere (75%). Zum letzten Probenzeitpunkt in der 24. Lebenswoche waren noch 26 Tiere (59,1%) PCV2b positiv.

Es waren 3 Tiere (6,8%) an 4 Zeitpunkten hintereinander, 18 Tiere (40,9%) an 3 und 8 Tiere (18,2%) an 2 Zeitpunkten hintereinander positiv.

Ein Tier (2,3%) war an einem zwischen zwei positiv getesteten Zeitpunkten negativ.

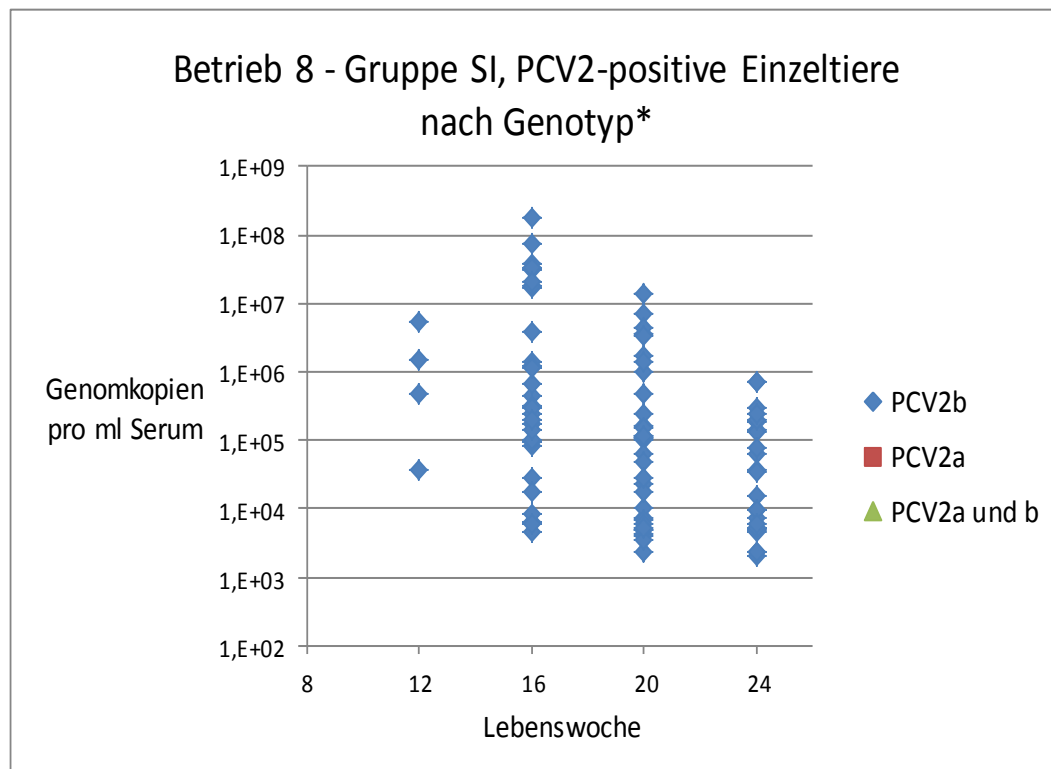


Abbildung 8: Virämie nach Genotypen, Betrieb 8

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 8 der Gruppe SI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 16: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 8, Gruppe SI\*

n = 44	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
SI Betrieb 8	PCV2a	N	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
	PCV2b	n	4	30	33	26
		MW	1,81E+06	1,51E+07	1,17E+06	1,12E+05
		StabW	2,36E+06	3,49E+07	2,83E+06	1,95E+05
		Min.	3,78E+04	4,60E+03	2,40E+03	2,00E+03
		Max.	5,23E+06	1,75E+08	1,42E+07	7,23E+05
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp auf der Ebene des Einzelbetriebes aus Gruppe SI (n auf die Tierzahl des Betriebes bezogen) angegeben.

#### 2.4.3. Betrieb 9

In Betrieb 9 der Gruppe SI wurden 42 Tiere ausgewertet. Es kam ausschließlich PCV2b vor. Die Verteilung der Genotypen und Höhe der Virämie jedes Einzeltiers zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abbildung 9 dargestellt.

##### 2.4.3.1. PCV2b:

In Betrieb 9 der Sauenimpfgruppe wurden in der 16. Lebenswoche die ersten 2 Tiere (4,8%) positiv auf PCV2b getestet. In der 20. Lebenswoche waren 21 Tiere (50%) und in der 24. Lebenswoche 35 Tiere (83,3%) positiv.

Ein Tier (2,4%) war über drei, 18 Tiere (42,9%) waren über zwei Zeitpunkte positiv.



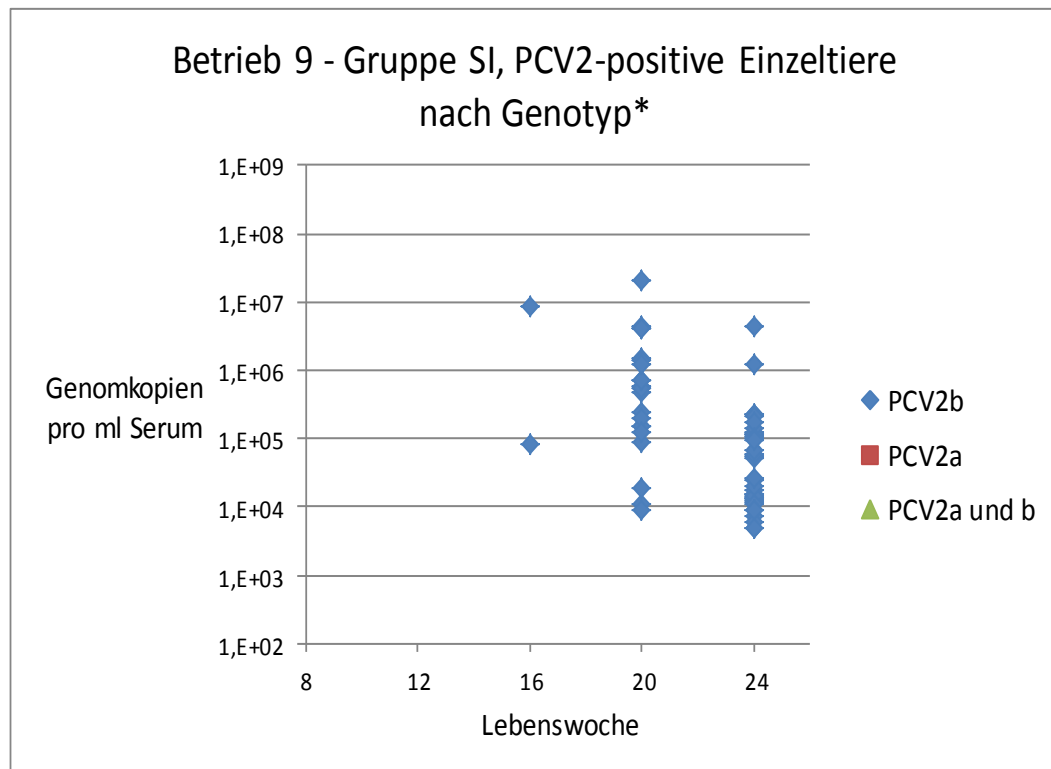


Abbildung 9: Virämie nach Genotypen, Betrieb 9

\*Jedem PCV2-positiven Einzeltier ist mittels eines farbigen Punkts der Genotyp zugeordnet, außerdem die jeweilige Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum in den verschiedenen Lebenswochen. Es sind alle Zeitpunkte von Betrieb 9 der Gruppe SI, an denen PCV2 nachgewiesen wurde, in der Abbildung erfasst.

Tabelle 17: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 9, Gruppe SI\*

n = 42	Genotyp		LW12	LW16	LW20	LW24
SI Betrieb 9	PCV2a	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0
	PCV2b	n	0	2	21	35
		MW	0	4,25E+06	1,98E+06	2,24E+05
		StabW	0	5,89E+06	4,54E+06	7,72E+05
		Min.	0	8,42E+04	9,00E+03	5,00E+03
		Max.	0	8,41E+06	2,08E+07	4,50E+06
	PCV2a+b	n	0	0	0	0
		MW	0	0	0	0
		StabW	0	0	0	0
		Min.	0	0	0	0
		Max.	0	0	0	0

\* Zudem ist die Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwert nach Genotyp auf der Ebene des Einzelbetriebes aus Gruppe SI (n auf die Tierzahl des Betriebes bezogen) angegeben.

### 3. Verschiedene PCV2-Genotypen in Einzeltieren

In einem Betrieb (1) aus der Gruppe NI kamen bei 5 von 45 Tieren (11,1%) im Verlauf der Studie verschiedene PCV2 Genotypen vor. In Tabelle 14 sind diese Änderungen dargestellt.

Tabelle 18: PCV2 Genotypen Gruppe NI, Betrieb 1\*

	LW16	LW20	LW24
Tier 1	a+b	-	b
Tier 4	a+b	a+b	-
Tier 5	a+b	b	b
Tier 6	a	a+b	a+b
Tier 7	a+b	b	b

\* Fünf Tiere mit verschiedenen PCV2-Genotypen simultan oder im Probenzeitraum der 16. bis 24. Lebenswoche.

Gelb: PCV2a und PCV2b,

Rot: PCV2a

Grün: Positiv für PCV2b

Weiß: Negatives Testergebnis

#### **4. PCV2-Sequenzen**

Die Genomsequenzen des phylogenetischen Stammbaums, der für die vorliegende Studie erstellt wurde, werden im Folgenden verglichen. Die Bedeutung der Nummerierung ist unter Punkt 8. (Proben-Codierung) bei Material und Methoden erläutert.

Der Verwandtschaftsgrad einiger Stämme, die aus gleichen Betrieben stammten, wie zum Beispiel beide PCV2a-Sequenzen aus Betrieb 1 der Nichtimpfgruppe (PCV2a\_1.16.2.16 und PCV2a\_1.6.1.16) lag bei 100%. Auch die Sequenzen aus Betrieb 9 der Sauenimpfgruppe (PCV2b\_9.6.3.24 und PCV2b\_9.11.2.20) waren zu 100% gleich. Betrieb 8 (PCV2b\_8.11.1.16 und PCV2b\_8.5.4.16) der Gruppe SI, Betrieb 3 der Gruppe FI (PCV2b\_3.15.3.16 und PCV2b\_3.5.3.16) und Betrieb 2 derselben Gruppe (2.8.3.16 und PCV2b\_2.14.2.12) hatten ebenfalls jeweils zwei 100% identische Stämme. Abgesehen von PCV2a- und PCV2b-Stämmen, die nur circa 95% identisch waren, war die geringste Übereinstimmung zweier Stämme in der vorliegenden Studie 98,6%. Dieser Übereinstimmungsgrad traf für die folgenden Paare zu (in Klammern sind die Bundesländer, aus denen die Betriebe stammten, abgekürzt geschrieben. Die Sequenzen wurden, der besseren Übersicht wegen, von 1. bis 16. durchnummeriert). Im Anschluss sind alle Sequenzen des phylogenetischen Stammbaums mit den zugehörigen Impfgruppen und den Bundesländern der Betriebsstandorte aufgelistet. Die Nummer des jeweiligen Betriebes und der Probenzeitpunkt sind der Codierung, wie in Material und Methoden unter Punkt 8. beschrieben, nach der Bezeichnung des Genotyps zu entnehmen.

15:4, 16:4, 15:5 und 16:5 (NDS:NRW), 15:8, 16:8, 15:9, 16:9 (NDS:NRW), 15:11, 16:11 (NDS:NRW), 15:14, 16:14 (NDS:BY)

1. PCV2a\_1.16.2.16, Gruppe NI, Nordrhein-Westfalen
2. PCV2a\_1.6.1.16, Gruppe NI, Nordrhein-Westfalen
3. PCV2a\_7.8.3.20, Gruppe SI, Bayern
4. PCV2b\_2.8.3.16, Gruppe NI, Nordrhein-Westfalen
5. PCV2b\_2.14.2.12, Gruppe NI, Nordrhein-Westfalen
6. PCV2b\_3.8.3.16, Gruppe NI, Niedersachsen
7. PCV2b\_3.15.3.16, Gruppe NI, Niedersachsen
8. PCV2b\_9.6.3.24, Gruppe SI, Nordrhein-Westfalen
9. PCV2b\_9.11.2.20, Gruppe SI, Nordrhein-Westfalen
10. PCV2b\_1.11.2.16, Gruppe NI, Nordrhein-Westfalen
11. PCV2b\_1.1.2.16, Gruppe NI, Nordrhein-Westfalen
12. PCV2b\_3.5.3.16, Gruppe NI, Niedersachsen
13. PCV2b\_3.12.4.16, Gruppe NI, Niedersachsen
14. PCV2b\_4.6.1.24, Gruppe FI, Bayern
15. PCV2b\_8.11.1.16, Gruppe SI, Niedersachsen
16. PCV2b\_8.5.4.16, Gruppe SI, Niedersachsen

Der Verwandtschaftsgrad der PCV2-Genomsequenzen aller für den phylogenetischen Stammbaum verwendeten Stämme kann Tabelle 19 entnommen werden.

Tabelle 19: Sequenzidentität der PCV2-Isolate\*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1		100	99,4	95,1	95,1	95,2	95,3	95,3	95,3	95,2	95,2	95,3	95,2	95,4	95,9	95,9	1
2	0,0		99,4	95,1	95,1	95,2	95,3	95,3	95,3	95,2	95,2	95,3	95,2	95,4	95,9	95,9	2
3	0,6	0,6		95,3	95,3	95,4	95,5	95,5	95,5	95,4	95,5	95,5	95,4	95,6	95,9	95,9	3
4	5,0	5,0	4,9		100	99,5	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	99,5	99,5	99,4	98,6	98,6	4
5	38,0	38,0	38,0	0,0		99,5	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	99,5	99,5	99,4	98,6	98,6	5
6	4,9	4,9	4,7	0,5	0,5		99,9	99,5	99,5	99,5	99,4	99,9	99,9	99,6	98,7	98,7	6
7	4,9	4,9	4,7	0,5	0,5	0,1		99,6	99,6	99,5	99,5	100	99,9	99,7	98,8	98,8	7
8	4,9	4,9	4,7	0,5	0,5	0,5	0,4		100	99,6	99,5	99,6	99,5	99,5	98,6	98,6	8
9	4,9	4,9	4,7	0,5	0,5	0,5	0,4	0,0		99,6	99,5	99,6	99,5	99,5	98,6	98,6	9
10	4,9	4,9	4,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4		99,8	99,5	99,5	99,4	98,7	98,7	10
11	5,0	5,0	4,8	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,2		99,5	99,4	99,4	98,6	98,6	11
12	4,9	4,9	4,7	0,5	0,5	0,1	0,0	0,4	0,4	0,5	0,5		99,9	99,7	98,8	98,8	12
13	4,9	4,9	4,7	0,5	0,5	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	0,6	0,1		99,6	98,7	98,7	13
14	4,7	4,7	4,6	0,6	0,6	0,4	0,3	0,5	0,5	0,6	0,6	0,3	0,4		98,6	98,6	14
15	4,3	4,3	4,3	1,4	1,4	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3	1,3	1,4		100	15
16	4,3	4,3	4,3	1,4	1,4	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3	1,3	1,4	0,0		16
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

\* Die Sequenzen des phylogenetischen Stammbaumes sind oberhalb der Tabelle aufgelistet und mit Nummern von 1 bis 16 versehen. Die rot markierten Sequenzen (1-3) entsprechen den PCV2a-Stämmen, die grün markierten Sequenzen (4-16) sind PCV2b-Isolate. Von links unten in der Tabelle bis zur schwarz gekennzeichneten Diagonale sind die Unterschiede der Sequenzen in Prozent, von rechts oben bis zur Diagonale der prozentuale Grad der Übereinstimmung der Sequenzen aufgezeigt.

#### 4.1. Monitoring von PCV2b-Genomsequenzen bei einem Einzeltier

Im Falle eines Tieres aus Betrieb 3 der Nichtimpfgruppe konnten Proben an vier aufeinander folgenden Zeitpunkten, Lebenswoche 12, 16, 20 und 24 sequenziert werden (3.12.4.12, 3.12.4.16, 3.12.4.20, 3.12.4.24). In Tabelle 20 ist die Übereinstimmung bzw. Abweichung der isolierten Virus-DNA in Prozent Übereinstimmung und Abweichung dargestellt. Demnach sind alle vier betreffenden Sequenzen, die an vier verschiedenen hintereinanderliegenden Probenterminen gewonnen wurden, mindestens zu 99,9% identisch.

Tabelle 20: PCV2b-Genomsequenz in einem Einzeltier\*

Lebenswoche	12	16	20	24	Lebenswoche
12		99,9	99,9	100,0	12
16	0,1		99,9	99,9	16
20	0,1	0,1		99,9	20
24	0,0	0,1	0,1		24
Lebenswoche	12	16	20	24	Lebenswoche

\*Grad der Übereinstimmung von PCV2b-Genomsequenzen, die beim selben Tier zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden

## **5. Phylogenetischer Stammbaum der nachgewiesenen PCV2**

Für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaums wurden Sequenzen aus allen PCV2a- oder PCV2b-positiven Betrieben von allen PCV2-positiven Probenzeitpunkten sequenziert.

Das Genom wird in zwei überlappenden Teilstücken vervielfältigt, die Sequenzierungsergebnisse werden daher softwaregestützt adaptiert. In einigen Fällen musste die Sequenzierung aufgrund schlechter Qualität wiederholt werden.

Von 48 Proben (4x PCV2a und 44x PCV2b), die zur Sequenzierung weitergeleitet wurden, konnten 34 Proben zu einem lückenlosen Gesamtgenom zusammengefügt werden. Insgesamt wurden 16 Sequenzen für den Phylogenetischen Stammbaum verwendet drei PCV2a-Sequenzen und 13 PCV2b-Sequenzen.

Durch den Vergleich mit Referenzstämmen konnten die drei PCV2a-Sequenzen (PCV2a\_1.16.2.16, PCV2a\_1.6.1.16 und PCV2a\_7.8.3.20) der Clade 2D zugeordnet werden.

Sequenzen des Genotyps PCV2b waren den Clades 1A und 1B zuzuordnen.

Zur Clade 1A gehören 11 Sequenzen (PCV2b\_2.8.3.16, PCV2b\_2.14.2.12, PCV2b\_3.8.3.16, PCV2b\_3.15.3.16, PCV2b\_9.6.3.24; PCV2b\_9.11.2.20, PCV2b\_1.11.2.16; PCV2b\_1.1.2.16; PCV2b\_3.5.3.16; PCV2b\_3.12.4.16; PCV2b\_4.6.1.24)

und zur Clade 1B zwei Sequenzen (PCV2b\_8.11.1.16 und PCV2b\_8.5.4.16).

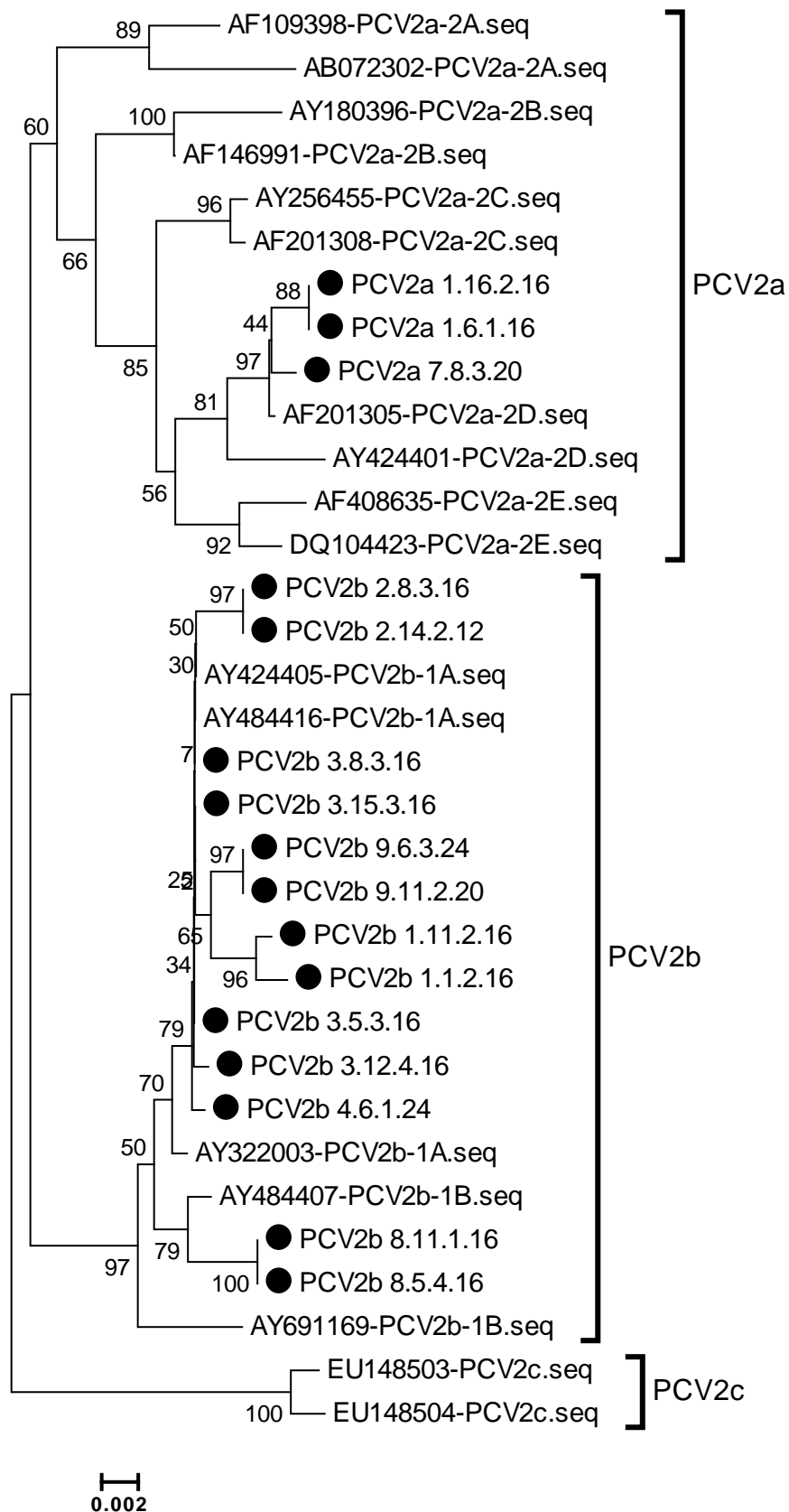


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum der PCV2-Isolate



## **V. DISKUSSION**

### **1. Häufigkeit PCV2-positiver Tiere**

Nach Segales et al. (2005a) ist PCV2 in der Hausschweinpopulation weltweit ubiquitär verbreitet. Diese Aussage deckt sich mit den in der vorliegenden Studie erhobenen Daten bezüglich der PCV2-positiven Betriebe, da das Virus in acht von neun eingeschlossenen Studienbetrieben mittels PCR nachgewiesen wurde. Von insgesamt 383 eingeschlossenen Tieren aus neun Betrieben wurden 217 Tiere (56,6%) im Studienverlauf mindestens einmal mittels qPCR PCV2-positiv getestet. 17 Tiere (4,4%) waren in der 12. Lebenswoche virämisch, 135 Tiere (35,2%) in der 16., 161 (42%) in der 20. Lebenswoche und 152 (39,7%) in der 24. Lebenswoche. Auffallend war bei diesen Ergebnissen, dass die meisten Tiere erst im Bereich der Mittel- und Endmast virämisch wurden. Die typische Altersklasse für die Entwicklung klinischer PMWS-Symptomatik liegt laut Harding (2004) deutlich früher, bei einem Alter von 7 bis 15 Wochen und somit deutlich früher, als in der vorliegenden Arbeit. In einer Studie von Ritzmann M. (2002), die Tiere von 156 bayerischen Schweinehaltern beinhaltete, wurde jedoch, ähnlich der vorliegenden Studie, festgestellt, dass der Anteil PCV2-positiver Schweine mit zunehmenden Alter ansteigt. Ein Erklärungsansatz könnte in der zunehmenden Durchseuchung der Schweinebestände liegen, da sich PCV2 auch durch Massenimpfung nicht aus Beständen eradikieren lässt (Feng et al., 2014). Durch die ubiquitäre Verbreitung von PCV2 in der Schweinepopulation und den zunehmenden Einsatz von PCV2-Impfstoffen in Zuchtherden kommen die meisten Sauen mit PCV2 in Kontakt und geben maternale Antikörper an die Ferkel weiter (Opriessnig et al., 2008a). Bedingt durch diese maternale Immunität verschiebt sich die Virämie möglicherweise weiter in Richtung Mast beziehungsweise Mastende.

Der derzeit vorherrschende PCV2-Genotyp ist PCV2b (Opriessnig et al., 2013a). Diese neue Variante von PCV2 verbreitete sich in den Jahren 2005-2006 in Amerika, während vor dieser Zeit ausschließlich PCV2a-Stämme gefunden worden waren (Cheung et al., 2007). Verschiedene Studien zeigten ähnliche Ergebnisse. In Kanada verbreitete sich der Genotyp PCV2b ab dem Jahr 2005

(Carman et al., 2008), ebenso wie in Irland (Allan et al., 2007). Weltweit wird seither PCV2b häufiger diagnostiziert als PCV2a (Gagnon et al., 2007, Patterson und Opriessnig, 2010), dieser Wechsel in Bezug auf den Genotyp ist im Allgemeinen mit schwerer verlaufenden PCV2-Erkrankungen assoziiert (Rose et al., 2012). Auch in der eigenen Untersuchung war der vorherrschende Genotyp PCV2b. In sieben von acht PCV2-positiven Betrieben konnte PCV2b nachgewiesen werden, in zwei Betrieben PCV2a. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie spiegeln somit die internationalen Entwicklungen wider. Als Erklärung für den Wandel werden unter anderem eine bessere Vermehrungsfähigkeit von PCV2b gegenüber PCV2a (Cheung und Greenlee, 2011), oder die Existenz eines bisher unerforschten beeinflussenden Faktors vermutet (Opriessnig et al., 2008b).

Der Anteil von PCV2b an den insgesamt 217 PCV2-positiven Tieren lag bei 93,1% (202 Tiere), während der Anteil von PCV2a-positiven Tieren bei nur 6,9% (15 Tiere) lag. In einer Studie aus Deutschland wurden bezüglich der Verteilung der Genotypen ähnliche Ergebnisse erzielt. Von Reiner et al. (2010) wurden Spanferkel auf PCV2 untersucht und PCV2-positive Proben in einer Folgestudie anschließend genotypisiert (Reiner et al., 2011). Dabei wurde festgestellt, dass von den PCV2-infizierten Tieren 98,4% dem Genotyp PCV2b und 4,8% dem Genotyp PCV2a zuzuordnen waren. Die Werte für mindestens einmal PCV2-positive Tiere lagen in der eigenen Studie im Vergleich dazu für PCV2b um 5,3% niedriger und für PCV2a um 2,1% höher. Berücksichtigt man bei der Vergleichsstudie das durchschnittliche Alter der Spanferkel von 3 Monaten, eignet sich der Zeitpunkt LW12 der eigenen Studie noch besser zum Vergleich, hier lag der Anteil der PCV2b-positiven an allen PCV2-positiven Tieren bei 100%, also um 1,6% höher als bei Reiner et al. (2011).

## **2. Häufigkeit PCV2-positive Tiere nach Impfgruppen**

Die neun eingeschlossenen Betriebe repräsentierten drei verschiedene PCV2-Impfgruppen (Nichtimpfer (NI), Ferkel (FI)- und Sauenimpfer (SI)). PCV2b kam in allen drei Impfgruppen vor (in den Gruppen NI und SI ab der 12. Lebenswoche, ab der 16. Lebenswoche in allen Gruppen). Über den gesamten Zeitraum der Studie kamen signifikant weniger PCV2b-positive Tiere in der Ferkelimpfgruppe

als in der Sauen- ( $p=0,000$ ) bzw. Nichtimpfgruppe ( $p=0,000$ ) vor. Die Anzahl PCV2b-positiver Tiere der Sauenimpfgruppe war außerdem signifikant geringer als die der Nichtimpfgruppe ( $p=0,000$ ). Eine ähnliche Verteilung der PCV2b-Nachweishäufigkeiten zwischen den Gruppen konnte auch in den verschiedenen Lebenswochen festgestellt werden. In der 12. Lebenswoche war die Nachweishäufigkeit für PCV2b in der Gruppe FI signifikant niedriger als in Gruppe NI ( $p=0,000$ ), in LW16 wurden PCV2b-positive Tiere in Gruppe FI signifikant seltener nachgewiesen als in den Gruppen NI und SI ( $p=0,000$ ), ebenso in LW20 und LW24.

Über den gesamten Zeitraum der Studie waren für den Genotyp PCV2a, wie für Genotyp b beschrieben, in Gruppe FI signifikant weniger positive Tiere als in Gruppe NI ( $p=0,007$ ) und SI ( $p=0,003$ ) nachweisbar. Die Gruppen NI und SI unterschieden sich bei PCV2a jedoch nicht signifikant. Unter Berücksichtigung der Zeitpunkte ergab sich für PCV2a zumindest in der 16. Lebenswoche für die Häufigkeitsverteilung in Bezug auf die Impfgruppen FI und NI ein Bild, das dem von PCV2b entsprach. Es waren in Gruppe NI signifikant mehr Tiere virämisch als in Gruppe FI ( $p=0,014$ ).

Dass sich durch das PCV2-Ferkelimpfen im Vergleich zum Nichtimpfen ein geringerer Prozentsatz PCV2-positiver Ferkel erzielen lässt, haben auch Fraile et al. (2012) gezeigt. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Studie für PCV2b eine signifikant geringere Anzahl virämischer Tiere in der Gruppe SI im Vergleich zu NI gezeigt werden, sowie im Vergleich von FI und SI. Dass PCV2b im Gegensatz zu PCV2a in allen Impfgruppen vorkommt, lässt sich insofern erklären, dass die Verbreitung von PCV2b im Vergleich zu Genotyp a in der Schweinepopulation heutzutage vorherrscht (Opriessnig et al., 2013a). Genotyp PCV2a konnte nur aus Tieren der Gruppen der Nichtimpfer und der Sauenimpfer, an jeweils drei aufeinander folgenden Beprobungszeitpunkten nachgewiesen werden. Aus keinem der aktiv immunisierten Ferkel konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg PCV2a nachgewiesen werden. Dass in Gruppe FI kein PCV2a-positives Tier vorkam, kann durch eine Senkung der Viruslast durch die wirksame Ferkelimpfung erklärt werden, wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben wurde (Fachinger et al., 2008, Kixmüller et al., 2008). Bei dem nachgewiesenen geringen Aufkommen von PCV2a mit schwachen Virämien

überrascht es daher nicht, dass kein PCV2a-positives Tier in der Ferkelimpfgruppe gefunden wurde. Auch die Tatsache, dass kommerzielle PCV2-Impfstoffe auf PCV2a basieren, könnte einen Selektionsvorteil für PCV2b-Stämme darstellen. Der Vermutung folgend, dass PCV2a-basierte Vakzinen schlechter vor PCV2b-Infektionen schützen könnten als homologe Vakzinen, wurden Versuche zur Überprüfung der Wirkung unternommen, die allerdings eine gute Kreuzprotektivität herausfanden (Fort et al., 2008, Opriessnig et al., 2008b).

### **3. PCV2 Virämie nach Genotypen**

In der vorliegenden Studie war für PCV2b-positive Tiere über alle Zeitpunkte hinweg und unabhängig von der Impfgruppe die durchschnittliche Anzahl an Virusgenomkopien pro ml Serum von PCV2b mit  $4,53 \times 10^6$  signifikant höher als die von PCV2a mit  $8,49 \times 10^4$  Genomkopien / ml Serum ( $p=0,002$ ). Möglicherweise ist PCV2a weniger pathogen als PCV2b und verursacht daher geringere Virämien. Die Tatsache, dass die Schwere der PCV2 assoziierten Erkrankungen parallel zur globalen Zunahme der PCV2b-Nachweise bei gleichzeitiger Abnahme des Genotyps a zugenommen hat (Rose et al., 2012), spricht für diese These. Brunborg et al. (2004), stellten fest, dass die Höhe der PCV2-Viruslast mit der klinischen PMWS-Erkrankung zusammenhängt. Sie zeigten, dass bei klinisch gesunden Schweinen die Viruslast von  $10^6$  Genomkopien pro ml Serum nie überschritten wurde, bei klinisch kranken Tieren hingegen Virämien von über  $10^7$  PCV2-Genomkopien je ml Serum erreicht wurden. Demnach waren die PCV2a-positiven Tiere in der vorliegenden Studie weiter von der kritischen Grenze zur klinischen PMWS-Erkrankung entfernt als die PCV2b-Positiven. Nach Impfgruppen aufgeteilt betrug die durchschnittliche Anzahl der PCV2b-Virusgenomkopien/ml Serum unabhängig vom Zeitpunkt für NI  $6,08 \times 10^6$ , für FI  $9,07 \times 10^4$ , und für SI  $2,77 \times 10^6$ , statistisch signifikant unterschieden sich dabei die Gruppen FI und SI ( $p=0,002$ ). Da die Anzahl der PCV2b positiven Tiere in der Gruppe der Ferkelimpfer sehr gering war, ergaben sich trotz deutlich geringerer Anzahl an Virusgenomkopien pro ml Serum hier keine Signifikanzen. Für PCV2a waren die Mittelwerte unabhängig vom Zeitpunkt für NI  $2,5 \times 10^5$  und für SI  $2,31 \times 10^4$ , beim statistischen Vergleich ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die in der Studie im Fall von PCV2b

nachgewiesene tendenziell niedrigste Virämie bei Tieren aus der Ferkelimpfgruppe und die Tatsache, dass PCV2a in der Ferkelimpfgruppe nicht nachgewiesen werden konnte, entspricht den Ergebnissen anderer Feldstudien in Bezug auf die PCV2-Ferkelimpfung. Kixmüller et al. (2008) stellten bei der Ferkelimpfung einer PMWS-betroffenen Herde eine signifikant niedrigere PCV2-Viruslast in einer Impfgruppe gegenüber einer Placebogruppe fest, auch in einer Studie von Fachinger et al. (2008) reduzierte die Impfung die Viruslast signifikant. Auch Velasova et al. (2013) bestätigten die Ferkelimpfung als wirksame Maßnahme zur PMWS-Bekämpfung. In diesen Studien wurde jedoch nicht zwischen den Gruppen PCV2a und PCV2b unterschieden, so dass die vorliegenden Ergebnisse die von anderen Autoren erhobenen Ergebnisse diesbezüglich ergänzen.

#### **4. Änderung des Genotyps bei Einzeltieren**

In der vorliegenden Studie wurde in einem Betrieb der Gruppe NI bei fünf von insgesamt 45 Tieren (11,1%) PCV2a und PCV2b gleichzeitig diagnostiziert. Diese Beobachtung konnte auch in anderen Studien wie der von Reiner et al. (2011) aus Deutschland gemacht werden, bei der dieses Phänomen als Nebebefund berichtet wird. Gerber et al. (2013) untersuchten einen Fall von PCV2-Impfversagen bei 10 Wochen alten Ferkeln. Sie beschrieben in diesem Zusammenhang das gleichzeitige Vorkommen beider Genotypen als häufig und erklärten es durch eine möglicherweise erhöhte PCV2-Replikation im Zusammenhang mit einer schlechten Wirkung der Vakzine. Ein höheres Risiko klinischer Erkrankung bei gleichzeitiger Infektion mit mehreren Genotypen wird von Zhai et al. (2011) angenommen. Die Ergebnisse von Tieren mit schlechtem Impfschutz passen zu den Ergebnissen der eigenen Studie, da die betroffenen Tiere PCV2-ungeimpft waren. In drei der Tiere, die PCV2a+b positiv getestet wurden, konnte zu einem späteren Probenzeitpunkt nur noch PCV2b nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass bei allen Tieren, in denen zunächst beide Genotypen nachgewiesen wurden, später nur noch PCV2b vorkommt, könnte mit einer besseren Replikationsfähigkeit von PCV2b im Vergleich zu PCV2a zusammenhängen, wie sie von Cheung und Greenlee (2011) bei Schweinenieren Zelllinien bewiesen wurde.

## 5. PCV2-Genomsequenzen

In der vorliegenden Studie wurden PCV2-Sequenzen, die aus denselben Betrieben von unterschiedlichen Tieren und Zeitpunkten stammten, untereinander verglichen. Aus einem Nichtimpfbetrieb konnte ein Sequenzpaar des PCV2-Genotyps a verglichen werden, die Übereinstimmung lag bei 100%. Für PCV2b lag bei vier von fünf Sequenzpaaren aus Betrieben aller Impfgruppen die Übereinstimmung ebenfalls bei 100%, in einem Fall bei 99,8%. Die Sequenzen waren also innerhalb der Betriebe zumeist untereinander identisch und über den Zeitraum der Studie hinweg stabil. Zu ähnlichen Ergebnissen führte auch eine Studie aus Schweden, bei der die PCV2-Sequenz eines klinisch gesunden Schweins aus dem Jahr 1993 mit einer Sequenz aus demselben Betrieb aus dem Jahr 2004 verglichen wurde. Die Sequenzen stimmten zu 99,1% überein, blieben also über 10 Jahre hinweg fast unverändert (Timmusk et al., 2008). Bei einem Einzeltier konnten in der vorliegenden Studie an vier aufeinanderfolgenden Probenzeitpunkten PCV2b-Isolate gewonnen werden, diese stimmten zu mindestens zu 99,9% überein, anders als in der Vergleichsstudie wird jedoch nur ein Zeitraum von 12 Wochen repräsentiert.

In der vorliegenden Studie konnten beim Vergleich von Sequenzen aus verschiedenen Betrieben und damit verschiedenen Regionen Deutschlands größere Unterschiede zwischen den Sequenzen festgestellt werden als innerhalb derselben Betriebe. Schon in Arbeiten aus dem Jahr 2000 wurde erläutert, dass es regional unterschiedliche PCV2-Stämme gibt (Fenaux et al., 2000) und diese verschiedenen Genotypen (PCV2a und PCV2b) zuzuordnen sind (Mankertz et al., 2000, Cheung et al., 2007).

In der vorliegenden Studie ergab sich zwischen einer PCV2a-Sequenz eines Betriebes aus Bayern und zwei Sequenzen aus Nordrhein-Westfalen (aus demselben Betrieb) eine Übereinstimmung von 99,4%. Eine PCV2b-Sequenz aus einem bayerischen Betrieb ergab im Vergleich mit acht Stämmen (drei Betriebe) aus Nordrhein-Westfalen Übereinstimmungen zwischen 99,4 und 99,5%, eine weitere aus Bayern stimmte, mit sechs aus Niedersachsen (zwei Betriebe) verglichen, zu 99,6 bis 99,7% überein. Der Identitätsvergleich von acht Sequenzen aus NRW (drei Betriebe) mit sechs Sequenzen aus Niedersachsen

(zwei Betriebe) ergab 98,6 bzw. 99,5%. Wenn man den Deckungsgrad dieser Sequenzen mit Veröffentlichungen vergleicht, in denen angegeben wird, dass die übliche Spanne für PCV2-Sequenzen zwischen 94,6 bis 99% liegt (Fenaux et al., 2000, de Boisseson et al., 2004), haben die isolierten Sequenzen der vorliegenden Studie einen sehr hohen Grad der Übereinstimmung.

Die Sequenzen der vorliegenden Studie wurden gemäß der von Olvera et al. (2007) beschriebenen Clades zur Subtypisierung der PCV2-Genotypen (PCV2a und PCV2b), klassifiziert. Die drei Sequenzen, die dem Genotyp PCV2a angehörten konnten der Clade 2D zugeordnet werden. Der zum Genotyp PCV2b gehörigen Clade 1B gehörten zwei der Sequenzen aus einem Betrieb der Gruppe SI in Niedersachsen an. Der Clade 1A gehörten die anderen elf PCV2b-Sequenzen aus allen drei Impfgruppen an, die von Betrieben aus Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen und Bayern stammten. Da aktuell der Genotyp PCV2b vorherrscht (Opriessnig et al., 2013a) und damit assoziiert schwerere Erkrankungen auftreten (Rose et al., 2012), ist das Vorkommen bestimmter Clades dieses Genotyps von besonderem Interesse. In der vorliegenden Studie wurden für den Genotyp PCV2b nur Stämme aus den Clades 1A und 1B, jedoch kein Stamm der Clade 1C gefunden. Auch international kommen Stämme der Clade 1C bisher selten vor, wie unter anderem in einer amerikanischen Prävalenzstudie über die Jahre 2010 und 2011 gezeigt werden konnte, alle PCV2b Stämme in dieser Studie gehörten der Clade 1B an (Shen et al., 2012). In einer Studie aus China, bei der PCV2b-Genomsequenzen aus den Jahren 2001 bis 2009 ausgewertet wurden, konnten 108 Isolate der Clades 1A und 1B und lediglich 19 der Clade 1C gewonnen werden (Li et al., 2010). In Europa wurde von Savic et al. (2012) erstmals ein PCV2b 1C-Stamm in Assoziation mit PMWS-erkrankten Hausschweinen entdeckt. Das Genom des entdeckten PCV2b 1C-Isolats war wiederum mit einem Stamm aus China (BDH (GenBank ID: HM038017)), für den eine gesteigerte Virulenz im Vergleich zu herkömmlichen PCV2b-Stämmen vermutet wird (Guo et al., 2010, Guo et al., 2012), zu 99,1% identisch. Die in diesem Zusammenhang in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde spiegeln zwar aufgrund der vergleichsweise geringen Betriebszahl nicht die Gesamtsituation in Deutschland wider, jedoch geben sie Hinweise auf die aktuelle Situation bezüglich des Auftretens von PCV2 Genotypen und diesen zugehörigen Clades.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

In der vorliegenden Studie wurden 383 Schweine aus neun deutschen Ferkelerzeugerbetrieben verschiedener Bundesländer mit unterschiedlichen Impfbereimen gegen das Porcine Circovirus Typ 2 (Nichtimpfer, Ferkelimpfer und Sauenimpfer) eingeschlossen. Die Tiere wurden von Geburt an bis zur Schlachtung hinsichtlich ihres PCV2-Virämiestatus unter Berücksichtigung der PCV2-Genotypen PCV2a und PCV2b zu insgesamt acht Probezeitpunkten verfolgt. Darüber hinaus wurde das PCV2-Genom von 16 Tieren verschiedener Impfbereimen und geographischer Herkunft sequenziert und mithilfe eines phylogenetischen Stammbaums den Subtypen der PCV2-Genotypen (PCV2a und PCV2b), den von Olvera et al. (2007) beschriebenen Clades zugeordnet. 217 Tiere (56,6%) wurden im Verlauf der Studie positiv auf PCV2 getestet. Die ersten 17 Tiere (4,4%) wurden in der 12. Lebenswoche virämisch, weitere Beprobungen in vierwöchigen Abständen ergaben 135 (35,2%), 161 (42%) und 152 (39,7%) PCV2-positive Tiere. Die höchsten PCV2-Virämien wurden in der Endmast ermittelt. Von den Seren 217 PCV2-positiver Tiere waren 93,1% dem Genotyp PCV2b und 6,9% dem Genotyp PCV2a zuzuordnen. PCV2b kam in allen drei Impfbereimen vor, PCV2a nur in der Nichtimpfbereimgruppe und Sauenimpfbereimgruppe, nicht jedoch in der Ferkelimpfbereimgruppe. Die durchschnittliche Anzahl der Virusgenomkopien pro ml Blutserum über alle PCV2-positiven Zeitpunkte hinweg lag für PCV2a bei  $8,49 \times 10^4$ . PCV2b war mit durchschnittlich  $4,53 \times 10^6$  Kopien/ml Serum signifikant höher ( $p=0,002$ ). Die meisten PCV2-positiven Tiere und die höchsten Virämien waren in der Gruppe zu finden, die ihre Tiere nicht gegen PCV2 vakzinierten. Es waren 92,1% der Tiere dieser Gruppe mindestens einmal positiv für PCV2b und 5,5% für PCV2a. In der Gruppe der Ferkelimpfer waren 7,8% der Tiere mindestens einmal PCV2b-positiv, kein Tier für PCV2a. In der Gruppe der Sauenimpfer waren 59,1% der Schweine mindestens einmal PCV2b-positiv, 7,8% für PCV2a. Bei fünf von 45 Tieren eines Betriebes der Nichtimpfbereimgruppe wurden PCV2a und PCV2b gleichzeitig in Einzeltieren festgestellt, bei drei der Tiere zu einem späteren Zeitpunkt hingegen nur noch PCV2b. Innerhalb einzelner Betriebe waren Genomsequenzen verschiedener Tiere und Zeitpunkte zwischen 99,8 und 100% identisch, zwischen verschiedenen



Betrieben zum Teil unterschiedlicher regionaler Lage war die minimale Übereinstimmung der Genomsequenzen 98,6%. Alle PCV2b Sequenzen waren den Clades 1A und 1B zuzuordnen, die PCV2a-Stämme der Clade 2D. Die in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse spiegeln aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl von in die Studie eingeschlossenen Betriebe nicht die Gesamtsituation in Deutschland wider. Dennoch können sie eine Orientierung geben, einerseits bezüglich des aktuellen Auftretens der PCV2-Genotypen PCV2a und PCV2b und deren zugehörigen Clades, andererseits hinsichtlich der Einflüsse von PCV2-Impfmaßnahmen auf deren Auftreten.

## VII. SUMMARY

383 piglets of nine German farms from different federal states were monitored from birth until slaughter at eight different time points. The farmers used different PCV2 vaccination programs. Accordingly, three groups were built (Non vaccination group NI, sow vaccination group SI and piglet vaccination group FI). At every time point the PCV2-viremia-status was tested for every piglet using q-PCR technology taking into account the PCV2-genotypes PCV2a and PCV2b. Moreover, the PCV2-genomes of 16 pigs belonging to different vaccination groups and different regions of Germany were sequenced and put into different clades of a phylogenetic tree which were described by Olvera et al. (2007). Altogether 217 animals (56.6%) were tested PCV2-positive in this study, the first 17 animals (4.4%) in week 12, then in 4-week intervals, every four weeks 135 pigs (35.2%), 161 (42%) and 152 pigs (39.7%). According to these results, the highest amounts of PCV2 were found at the end of the fattening period. From the 217 positive blood serum samples 93.1% and 6.9% belonged to the genotypes PCV2b and PCV2a, respectively. PCV2b was found in all of the three vaccination groups, PCV2a only in groups NI and SI, never in group FI. The average quantity of viral genome copies per ml bloodserum over the entire time of the study was  $8.49 \times 10^4$  and  $4.53 \times 10^6$  for PCV2a and PCV2b, respectively, which was significantly higher for PCV2b ( $p=0.002$ ). Most of the PCV2 positive animals and the highest amounts of viraemia were found in group NI. 92.1% of these animals were at least once positive for PCV2b and 5.5% for PCV2a. In group FI 7.8% were at least once positive for PCV2b, no animal for PCV2a. In group SI 59.1% of the pigs were at least once positive for PCV2b, 7.8% for PCV2a. 5 of 45 pigs in one NI-farm were tested PCV2a and PCV2b positive simultaneously and switched to PCV2b later. Within single farms sequences from different pigs and time points were identical to a degree of 99.8% to 100%, while between different farms of various origins the minimum concordance was 98.6%. All of the PCV2b sequences belonged to clades 1A and 1B, PCV2a sequences belonged to clade 2D. Because of the comparatively small amount of farms included in our study the results will probably not reflect the whole situation in Germany. Nevertheless, the results give an overview about the emergence of PCV2 genotypes and appendent

clades on the one hand and the impact of vaccination measures on their appearance on the other hand.

## VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Anteil PCV2-positiver Tiere aufgeteilt nach Genotypen.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 2: Virämie nach Genotypen, Betrieb 1 .....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 3: Virämie nach Genotypen, Betrieb 2 .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 4: Virämie nach Genotypen, Betrieb 3 .....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 5: Virämie nach Genotypen, Betrieb 4 .....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 6: Virämie nach Genotypen, Betrieb 5 .....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 7: Virämie nach Genotypen, Betrieb 7 .....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 8: Virämie nach Genotypen, Betrieb 8 .....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 9: Virämie nach Genotypen, Betrieb 9 .....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum der PCV2-Isolate .....</i>	<i>72</i>

## IX. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: PCV2-Vakzinen.....</i>	32
<i>Tabelle 2: Daten zu den Studienbetrieben*.....</i>	35
<i>Tabelle 3: In den Studienbetrieben 1-9 durchgeführte Impfprogramme *.....</i>	35
<i>Tabelle 4: Primer und Sonde für die PCV2-real-time PCR (Zhao et al., 2010)...</i>	38
<i>Tabelle 5: Primer und Sonde für die PCV2-Genotyp-PCR (Opriessnig et al., 2010) (modifiziert*).....</i>	38
<i>Tabelle 6: Primer für die PCV2-Sequenzierungs-PCR nach (Gagnon et al., 2007).....</i>	39
<i>Tabelle 7: Mindestens 1x PCV2-positive Tiere für PCV2 Genotyp a, b oder a+b*.....</i>	43
<i>Tabelle 8: Anzahl PCV2-positiver Tiere nach Impfgruppen*.....</i>	46
<i>Tabelle 9: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere*.....</i>	48
<i>Tabelle 10: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 1, Gruppe NI*52</i>	
<i>Tabelle 11: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 2, Gruppe NI*54</i>	
<i>Tabelle 12: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 3, Gruppe NI*56</i>	
<i>Tabelle 13: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 4, Gruppe FI*58</i>	
<i>Tabelle 14: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 5, Gruppe FI*60</i>	
<i>Tabelle 15: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 7, Gruppe SI*62</i>	
<i>Tabelle 16: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 8, Gruppe SI*64</i>	
<i>Tabelle 17: Mittlere Virämie PCV2-positiver Tiere des Betriebes 9, Gruppe SI*66</i>	
<i>Tabelle 18: PCV2 Genotypen Gruppe NI, Betrieb 1*.....</i>	66
<i>Tabelle 19: Sequenzidentität der PCV2-Isolate*.....</i>	69
<i>Tabelle 20: PCV2b-Genomsequenz in einem Einzeltier*.....</i>	70

## **X. LITERATURVERZEICHNIS**

ALARCON, P., RUSHTON, J. & WIELAND, B. 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - an economic disease model. *Prev Vet Med*, 110, 88-102.

ALARCON, P., VELASOVA, M., MASTIN, A., NEVEL, A., STARK, K. D. & WIELAND, B. 2011. Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Prev Vet Med*, 101, 182-91.

ALLAN, G., KRAKOWKA, S., ELLIS, J. & CHARREYRE, C. 2012. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus Res*, 164, 4-9.

ALLAN, G., MEEHAN, B., TODD, D., KENNEDY, S., MCNEILLY, F., ELLIS, J., CLARK, E. G., HARDING, J., ESPUNA, E., BOTNER, A. & CHARREYRE, C. 1998a. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec*, 142, 467-8.

ALLAN, G. M. & ELLIS, J. A. 2000. Porcine Circoviruses: A Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 3-14.

ALLAN, G. M., MCNEILLY, F., ELLIS, J., KRAKOWKA, S., MEEHAN, B., MCNAIR, I., WALKER, I. & KENNEDY, S. 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol*, 145, 2421-9.

ALLAN, G. M., MCNEILLY, F., KENNEDY, S., DAFT, B., CLARKE, E. G., ELLIS, J. A., HAINES, D. M., MEEHAN, B. M. & ADAIR, B. M. 1998b. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest*, 10, 3-10.

ALLAN, G. M., MCNEILLY, F., MCMENAMY, M., MCNAIR, I., KRAKOWKA, S. G., TIMMUSK, S., WALLS, D., DONNELLY, M., MINAHIN, D., ELLIS, J., WALLGREN, P. & FOSSUM, C. 2007. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest*, 19, 668-73.

BAYLIS, S. A., FINSTERBUSCH, T., BANNERT, N., BLUMEL, J. & MANKERTZ, A. 2011. Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine*, 29, 690-7.

BEACH, N. M., CORDOBA, L., KENNEY, S. P. & MENG, X. J. 2011. Productive infection of human hepatocellular carcinoma cells by porcine circovirus type 1. *Vaccine*, 29, 7303-6.

BOLIN, S. R., STOFFREGEN, W. C., NAYAR, G. P. & HAMEL, A. L. 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest*, 13, 185-94.

BRUNBORG, I. M., JONASSEN, C. M., MOLDAL, T., BRATBERG, B., LIUM, B., KOENEN, F. & SCHONHEIT, J. 2007. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J Vet Diagn Invest*, 19, 368-75.

BRUNBORG, I. M., MOLDAL, T. & JONASSEN, C. M. 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods*, 122, 171-8.

CALSAMIGLIA, M., SEGALES, J., QUINTANA, J., ROSELL, C. & DOMINGO, M. 2002. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting

syndrome. *J Clin Microbiol*, 40, 1848-50.

CARMAN, S., CAI, H. Y., DELAY, J., YOUSSEF, S. A., MCEWEN, B. J., GAGNON, C. A., TREMBLAY, D., HAZLETT, M., LUSIS, P., FAIRLES, J., ALEXANDER, H. S. & VAN DREUMEL, T. 2008. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease--2004-2006. *Can J Vet Res*, 72, 259-68.

CHAE, C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J*, 168, 41-9.

CHAE, C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J*, 169, 326-36.

CHENG, C. C., LEE, Y. F., LIN, N. N., WU, C. L., TUNG, K. C. & CHIU, Y. T. 2011. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in Swine associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 245728.

CHEUNG, A. K. 2007. Homologous recombination plays minor role in excision of unit-length viral genomes from head-to-tail direct tandem repeats of porcine circovirus during DNA replication in *Escherichia coli*. *Arch Virol*, 152, 1531-9.

CHEUNG, A. K. & GREENLEE, J. J. 2011. Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. *Virus Res*, 155, 358-62.

CHEUNG, A. K., LAGER, K. M., KOHUTYUK, O. I., VINCENT, A. L., HENRY, S. C., BAKER, R. B., ROWLAND, R. R. & DUNHAM, A. G. 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol*, 152, 1035-44.



CHIOU, M. T., LIN, C. N., YANG, C. Y., SU, G. S., LIN, C. F. & CHANG, T. C. 2012. Genotypic change and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in Taiwanese pig herds. *J Vet Med Sci*, 74, 1303-10.

CHOI, C. & CHAE, C. 1999. In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol*, 121, 265-70.

CORTEY, M., OLVERA, A., GRAU-ROMA, L. & SEGALÉS, J. 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet Microbiol*, 149, 522-3.

DE BOISSESON, C., BEVEN, V., BIGARRE, L., THIERY, R., ROSE, N., EVENO, E., MADEC, F. & JESTIN, A. 2004. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol*, 85, 293-304.

DULAC, G. C. & AFSHAR, A. 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res*, 53, 431-3.

DUPONT, K., NIELSEN, E. O., BAEKBO, P. & LARSEN, L. E. 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol*, 128, 56-64.

ELLIS, J., HASSARD, L., CLARK, E., HARDING, J., ALLAN, G., WILLSON, P., STROKAPPE, J., MARTIN, K., MCNEILLY, F., MEEHAN, B., TODD, D. & HAINES, D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*, 39, 44-51.

FACHINGER, V., BISCHOFF, R., JEDIDIA, S. B., SAALMULLER, A. & ELBERS, K. 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*, 26, 1488-99.

FENAUX, M., HALBUR, P. G., GILL, M., TOTH, T. E. & MENG, X. J. 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol*, 38, 2494-503.

FENG, H., BLANCO, G., SEGALÉS, J. & SIBILA, M. 2014. Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet Microbiol*, 172, 92-9.

FORT, M., SIBILA, M., ALLEPUZ, A., MATEU, E., ROERINK, F. & SEGALÉS, J. 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine*, 26, 1063-71.

FRAILE, L., SIBILA, M., NOFRARIAS, M., LOPEZ-JIMENEZ, R., HUERTA, E., LLORENS, A., LOPEZ-SORIA, S., PEREZ, D. & SEGALÉS, J. 2012. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. *Vet Microbiol*, 161, 229-34.

GAGNON, C. A., MUSIC, N., FONTAINE, G., TREMBLAY, D. & HAREL, J. 2010. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol*, 144, 18-23.

GAGNON, C. A., TREMBLAY, D., TIJSSEN, P., VENNE, M. H., HOUDE, A. & ELAHI, S. M. 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J*, 48, 811-9.

GERBER, P. F., JOHNSON, J., SHEN, H., STRIEGEL, D., XIAO, C. T., HALBUR, P. G. & OPRIESSNIG, T. 2013. Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated

pigs. *Res Vet Sci*, 95, 775-81.

GIBBS, M. J. & WEILLER, G. F. 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8022-7.

GRAU-ROMA, L. & SEGALES, J. 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet Microbiol*, 119, 144-51.

GUO, L., FU, Y., WANG, Y., LU, Y., WEI, Y., TANG, Q., FAN, P., LIU, J., ZHANG, L., ZHANG, F., HUANG, L., LIU, D., LI, S., WU, H. & LIU, C. 2012. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. *PLoS One*, 7, e41463.

GUO, L. J., LU, Y. H., WEI, Y. W., HUANG, L. P. & LIU, C. M. 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol J*, 7, 273.

HAAKE, M., PALZER, A., RIST, B., WEISSENBACHER-LANG, C., FACHINGER, V., EGGEN, A., RITZMANN, M. & EDDICKS, M. 2014. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Vet Microbiol*, 168, 272-80.

HAMEL, A. L., LIN, L. L., SACHVIE, C., GRUDESKE, E. & NAYAR, G. P. 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res*, 64, 44-52.

HAMMER, R., RITZMANN, M., PALZER, A., LANG, C., HAMMER, B., PESCH, S. & LADINIG, A. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections in wild boar (*Sus scrofa*) in

southwestern Germany. *J Wildl Dis*, 48, 87-94.

HARDING, J. C. 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol*, 98, 131-5.

HORLEN, K. P., DRITZ, S. S., NIETFELD, J. C., HENRY, S. C., HESSE, R. A., OBERST, R., HAYS, M., ANDERSON, J. & ROWLAND, R. R. 2008. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc*, 232, 906-12.

JACOBSEN, B., KRUEGER, L., SEELIGER, F., BRUEGMANN, M., SEGALÉS, J. & BAUMGAERTNER, W. 2009. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol*, 138, 27-33.

KIM, J., HA, Y., JUNG, K., CHOI, C. & CHAE, C. 2004. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res*, 68, 218-21.

KIXMÖLLER, M., RITZMANN, M., EDDICKS, M., SAALMÜLLER, A., ELBERS, K. & FACHINGER, V. 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*, 26, 3443-51.

KRAKOWKA, S., ELLIS, J. A., MEEHAN, B., KENNEDY, S., MCNEILLY, F. & ALLAN, G. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol*, 37, 254-63.

LAROCHELLE, R., MAGAR, R. & D'ALLAIRE, S. 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res*, 90, 101-12.

LI, W., WANG, X., MA, T., FENG, Z., LI, Y. & JIANG, P. 2010. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. *Virus Genes*, 40, 244-51.

LIU, J., CHEN, I. & KWANG, J. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol*, 79, 8262-74.

MACKAY, I. M., ARDEN, K. E. & NITSCHKE, A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30, 1292-305.

MAJZOUB M., R. M., TRUYEN U., MATIASEK K., HEINRITZI K., HERMANN W. 2005. Porzines Dermatitis-Nephropathie-Syndrom (PDNS) - eine Übersicht über pathomorphologische Veränderungen. *Tierärztl. Praxis*, 33, 169-174.

MANKERTZ, A. 2008. Circoviruses. In: EDITORS-IN-CHIEF: , B. W. J. M. & REGENMORTEL, M. H. V. V. (eds.) *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*. Oxford: Academic Press.

MANKERTZ, A., DOMINGO, M., FOLCH, J. M., LECANN, P., JESTIN, A., SEGAL, J., CHMIELEWICZ, B., PLANA-DURAN, J. & SOIKE, D. 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res*, 66, 65-77.

MANKERTZ, A., MANKERTZ, J., WOLF, K. & BUHK, H. J. 1998. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol*, 79 ( Pt 2), 381-4.

MCNEILLY, F., KENNEDY, S., MOFFETT, D., MEEHAN, B. M., FOSTER, J. C., CLARKE, E. G., ELLIS, J. A., HAINES, D. M., ADAIR, B. M. & ALLAN, G. M. 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for

the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods*, 80, 123-8.

MEEHAN, B. M., CREELAN, J. L., MCNULTY, M. S. & TODD, D. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol*, 78 ( Pt 1), 221-7.

NAWAGITGUL, P., HARMS, P. A., MOROZOV, I., THACKER, B. J., SORDEN, S. D., LEKCHAROENSUK, C. & PAUL, P. S. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 33-40.

NAWAGITGUL, P., MOROZOV, I., BOLIN, S. R., HARMS, P. A., SORDEN, S. D. & PAUL, P. S. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*, 81, 2281-7.

O'CONNOR, B., GAUVREAU, H., WEST, K., BOGDAN, J., AYROUD, M., CLARK, E. G., KNOBY, C., ALLAN, G. & ELLIS, J. A. 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J*, 42, 551-3.

OLVERA, A., CORTEY, M. & SEGALÉS, J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*, 357, 175-85.

OLVERA, A., SIBILA, M., CALSAMIGLIA, M., SEGALÉS, J. & DOMINGO, M. 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods*, 117, 75-80.

OPRIESSNIG, T., GERBER, P. F., XIAO, C. T., HALBUR, P. G., MATZINGER, S. R. & MENG, X. J. 2014. Commercial PCV2a-based vaccines are effective in protecting naturally PCV2b-infected finisher pigs against experimental challenge with a 2012 mutant PCV2. *Vaccine*, 32, 4342-8.

OPRIESSNIG, T., GIMENEZ-LIROLA, L. G. & HALBUR, P. G. 2011a. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev*, 12, 133-48.

OPRIESSNIG, T. & LANGOHR, I. 2013. Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Vet Pathol*, 50, 23-38.

OPRIESSNIG, T., MADSON, D. M., ROOF, M., LAYTON, S. M., RAMAMOORTHY, S., MENG, X. J. & HALBUR, P. G. 2011b. Experimental reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated enteritis in pigs infected with PCV2 alone or concurrently with *Lawsonia intracellularis* or *Salmonella typhimurium*. *J Comp Pathol*, 145, 261-70.

OPRIESSNIG, T., MCKEOWN, N. E., HARMON, K. L., MENG, X. J. & HALBUR, P. G. 2006. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 923-9.

OPRIESSNIG, T., MENG, X. J. & HALBUR, P. G. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest*, 19, 591-615.

OPRIESSNIG, T., O'NEILL, K., GERBER, P. F., DE CASTRO, A. M., GIMENEZ-LIROLA, L. G., BEACH, N. M., ZHOU, L., MENG, X. J., WANG, C. & HALBUR, P. G. 2013a. A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*, 31, 487-94.

OPRIESSNIG, T., PATTERSON, A. R., ELSENER, J., MENG, X. J. & HALBUR, P. G. 2008a. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clin Vaccine Immunol*, 15, 397-401.

OPRIESSNIG, T., PRICKETT, J. R., MADSON, D. M., SHEN, H. G., JUHAN, N. M., POGRANICHNIY, R. R., MENG, X. J. & HALBUR, P. G. 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Vet Res*, 41, 31.

OPRIESSNIG, T., RAMAMOORTHY, S., MADSON, D. M., PATTERSON, A. R., PAL, N., CARMAN, S., MENG, X. J. & HALBUR, P. G. 2008b. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol*, 89, 2482-91.

OPRIESSNIG, T., XIAO, C. T., GERBER, P. F. & HALBUR, P. G. 2013b. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet Microbiol*, 163, 177-83.

PATTERSON, A. R. & OPRIESSNIG, T. 2010. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev*, 11, 217-34.

PHENIX, K. V., WESTON, J. H., YPELAAR, I., LAVAZZA, A., SMYTH, J. A., TODD, D., WILCOX, G. E. & RAIDAL, S. R. 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae. *J Gen Virol*, 82, 2805-9.

QUINTANA, J., SEGALÉS, J., ROSELL, C., CALSAMIGLIA, M., RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M., CHIANINI, F., FOLCH, J. M.,



MALDONADO, J., CANAL, M., PLANA-DURAN, J. & DOMINGO, M. 2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec*, 149, 357-61.

REGNARD, G. L., BOYES, R. S., MARTIN, R. O., HITZEROTH, II & RYBICKI, E. P. 2014. Beak and feather disease virus: correlation between viral load and clinical signs in wild Cape parrots (*Poicephalus robustus*) in South Africa. *Arch Virol*.

REINER, G., BRONNERT, B., HOHLOCH, C., FRESEN, C., HAACK, I., WILLEMS, H. & REINACHER, M. 2010. Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol*, 145, 1-8.

REINER, G., BRONNERT, B., HOHLOCH, C., REINACHER, M. & WILLEMS, H. 2011. Distribution of ORF2 and ORF3 genotypes of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in wild boars and domestic pigs in Germany. *Vet Microbiol*, 148, 372-6.

RITZMANN M., M. M., HERMANN S. W., HEINRITZ K., TRUYEN U. 2005. Klinische, hämatologische und klinisch-chemische Befunde beim porzinen Dermatitis-Nephropathie-Syndrom (PDNS). *Tierärztl Praxis*, 33, 299-303.

RITZMANN M., V. K., MAJZOU B. M., HERMANN S. W., HEINRITZ K., GEIßLER K., TRUYEN U. 2002. Untersuchungen zur Verbreitung des porzinen Circovirus Typ 2 in Bayern. *Tierärztl. Praxis*, 30, 386-391.

ROSE, N., OPRIESSNIG, T., GRASLAND, B. & JESTIN, A. 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164, 78-89.

ROVIRA, A., BALASCH, M., SEGALÉS, J., GARCIA, L., PLANA-DURAN, J., ROSELL, C., ELLERBROK, H., MANKERTZ, A. & DOMINGO, M. 2002.

Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol*, 76, 3232-9.

SAHA, D., LEFEBVRE, D. J., DUCATELLE, R., DOORSSELAERE, J. V. & NAUWYNCK, H. J. 2011. Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine foetuses. *BMC Vet Res*, 7, 64.

SAVIC, B., MILICEVIC, V., JAKIC-DIMIC, D., BOJKOVSKI, J., PRODANOVIC, R., KURELJUSIC, B., POTKONJAK, A. & SAVIC, B. 2012. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Serbia. *Arch Virol*, 157, 21-8.

SCHMOLL, F., LANG, C., STEINRIGL, A. S., SCHULZE, K. & KAUFFOLD, J. 2008. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology*, 69, 814-21.

SEELIGER, F. A., BRUGMANN, M. L., KRUGER, L., GREISER-WILKE, I., VERSPOHL, J., SEGALES, J. & BAUMGARTNER, W. 2007. Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Vet Pathol*, 44, 621-34.

SEGALES, J. 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*, 164, 10-9.

SEGALES, J., ALLAN, G. M. & DOMINGO, M. 2005a. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev*, 6, 119-42.

SEGALES, J., CALSAMIGLIA, M., OLVERA, A., SIBILA, M., BADIELLA, L. & DOMINGO, M. 2005b. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol*, 111, 223-9.

SEGALES, J., OLVERA, A., GRAU-ROMA, L., CHARREYRE, C., NAUWYNCK, H., LARSEN, L., DUPONT, K., MCCULLOUGH, K., ELLIS, J., KRAKOWKA, S., MANKERTZ, A., FREDHOLM, M., FOSSUM, C., TIMMUSK, S., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., BEATTIE, V., ARMSTRONG, D., GRASSLAND, B., BAEKBO, P. & ALLAN, G. 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec*, 162, 867-8.

SHEN, H. G., HALBUR, P. G. & OPRIESSNIG, T. 2012. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *J Gen Virol*, 93, 1345-55.

SMITH, W. J., THOMSON, J. R. & DONE, S. 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec*, 132, 47.

SZEREDI, L. & SZENTIRMAI, C. 2008. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet Hung*, 56, 101-9.

THOMSON, J. R., HIGGINS, R. J., SMITH, W. J. & DONE, S. H. 2002. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 49, 430-7.

TIMMUSK, S., WALLGREN, P., BRUNBORG, I. M., WIKSTROM, F. H., ALLAN, G., MEEHAN, B., MCMENAMY, M., MCNEILLY, F., FUXLER, L., BELAK, K., PODERSOO, D., SAAR, T., BERG, M. & FOSSUM, C. 2008. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes*, 36, 509-20.

TISCHER, I., GELDERBLOM, H., VETTERMANN, W. & KOCH, M. A. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295, 64-66.

TISCHER, I., MIELDS, W., WOLFF, D., VAGT, M. & GRIEM, W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol*, 91, 271-6.

TISCHER, I., RASCH, R. & TOCHTERMANN, G. 1974. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A*, 226, 153-67.

TODD, D., MCNULTY, M. S., ADAIR, B. M. & ALLAN, G. M. 2001a. Animal circoviruses. *Advances in Virus Research*. Academic Press.

TODD, D., SCOTT, A. N., FRINGUELLI, E., SHIVRAPRASAD, H. L., GAVIER-WIDEN, D. & SMYTH, J. A. 2007. Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathol*, 36, 75-81.

TODD, D., WESTON, J. H., SOIKE, D. & SMYTH, J. A. 2001b. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology*, 286, 354-62.

TRIBLE, B. R. & ROWLAND, R. R. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res*, 164, 68-77.

VELASOVA, M., ALARCON, P., WERLING, D., NEVEL, A. & WIELAND, B. 2013. Effectiveness of porcine circovirus type 2 vaccination in reducing the severity of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet J*, 197, 842-7.

WANG, F., GUO, X., GE, X., WANG, Z., CHEN, Y., CHA, Z. & YANG, H. 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res*, 145, 151-6.

WELLENBERG, G. J., BOUWKAMP, F. T., WOLF, P. J., SWART, W. A., MOMBARG, M. J. & DE GEE, A. L. 2010. A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. *Vet Microbiol*, 142, 217-24.

WELLENBERG, G. J., PESCH, S., BERNDSEN, F. W., STEVERINK, P. J., HUNNEMAN, W., VAN DER VORST, T. J., PEPERKAMP, N. H., OHLINGER, V. F., SCHIPPERS, R., VAN OIRSCHOT, J. T. & DE JONG, M. F. 2000. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. *Vet Q*, 22, 167-72.

WEN, H., WU, Y., YANG, C., ZHANG, X., LIAN, C., CHEN, H. & HAN, L. 2014. Comments on duck circovirus (DuCV) genotype definition. *Gene*, 538, 207-8.

WEST, K. H., BYSTROM, J. M., WOJNAROWICZ, C., SHANTZ, N., JACOBSON, M., ALLAN, G. M., HAINES, D. M., CLARK, E. G., KRAKOWKA, S., MCNEILLY, F., KONOBY, C., MARTIN, K. & ELLIS, J. A. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest*, 11, 530-2.

WHITE, M. & HIGGINS, R. J. 1993. Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec*, 132, 199.

YANG, B., WANG, H., NESKE, F., BAYLIS, S. A., HO, C., LESTER, P., CHEN, Q. & BLUMEL, J. 2013. Porcine circovirus (PCV) removal by Q Sepharose fast flow chromatography. *Biotechnol Prog*.

ZHAI, S. L., CHEN, S. N., WEI, Z. Z., ZHANG, J. W., HUANG, L., LIN, T., YUE, C., RAN, D. L., YUAN, S. S., WEI, W. K. & LONG, J. X. 2011. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virol J*, 8, 517.

ZHAO, K., HAN, F., ZOU, Y., ZHU, L., LI, C., XU, Y., ZHANG, C., TAN, F., WANG, J., TAO, S., HE, X., ZHOU, Z. & TANG, X. 2010. Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based real-time PCR. *Virol J*, 7, 374.

## **XI. DANKSAGUNG**

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann für die Bereitstellung dieses interessanten und hochaktuellen Themas bedanken, außerdem dafür, dass mir und allen Kollegen seine Tür bei Fragen stets offensteht und er für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Klinik sorgt.

Von Herzen danke ich meinem Betreuer, Herrn Dr. Matthias Eddicks, der mich von Anfang bis Ende, auch durch schwierige Phasen während des Entstehungsprozesses dieser Doktorarbeit begleitet hat und immer die passenden Worte fand, wenn Probleme auftauchten.

Vielen Dank an Herrn Dr. Robert Fux und sein nettes Team, die mich in der Virologie bei der Auswertung meiner Proben so lange Zeit unterstützt und beraten haben.

Der Firma Zoetis danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung einer derart aufwändigen epidemiologischen Studie.

Auch meinem Kollegen Nils Walhöfer und seinen Eltern gilt besonderer Dank! Nils war während des praktischen Teils der Doktorarbeit mein ständiger Begleiter, außerdem durfte ich seine Familie kennenlernen und war dort im Rahmen unserer Probennahmen in Nordrhein-Westfalen häufiger Übernachtungsgast.

Ein besonderer Dank gilt allen Kollegen und Mitdoktoranden, die Verständnis hatten für meine häufige Abwesenheit von der Klinik während des praktischen Teils der Doktorarbeit.

Danke auch an die lieben Kollegen, die mir insbesondere in der Endphase der Doktorarbeit mit Rat und Tat sowie netten Gesprächen zur Seite standen, mich durch diese stressige Zeit begleitet und mir in der Klinik Arbeit abgenommen haben, damit mir mehr Zeit zum Schreiben bleibt. Allen voran ist hier Lisa Beffort zu nennen, außerdem Christine Weiß, Jasmin Stark und Marie Isernhagen.

Danke an alle Landwirte aus diversen Bundesländern und ihre Schweine, ohne die die Studie nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an meine Frau und Familie für die Unterstützung über all die Jahre!